

Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

# ANÁLISIS MOLECULAR Y FUNCIONAL DE *DACHS* DURANTE EL DESARROLLO LARVARIO DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Memoria presentada por Eva Revilla Yates para optar al grado de Doctor en  
Biociencias moleculares por la Universidad Autónoma de Madrid.

Directora: Dra. Isabel Rodríguez Enríquez

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM)  
Madrid mayo de 2014





## AGRADECIMIENTOS

---

Es curioso, durante la tesis he pensado un montón de veces en este apartado. Es genial que exista un apartado de la tesis en el que puedas dejar patente lo agradecida que estás a la gente que durante los últimos años ha compartido contigo cada día. Gente que te ha enseñado, que ha tenido paciencia y que muchas veces ha sabido darte los ánimos necesarios para volver al día siguiente. Sin embargo, ahora que estoy delante de una hoja en blanco no se me ocurre cuál puede ser la mejor manera de empezar. Me da la sensación de que todo lo que diga será poco, que me dejaré a alguien que realmente ha sido esencial o incluso que no seré capaz de expresar toda esa gratitud que estoy segura de sentir.

Quizá la manera más fácil de empezar sea con la persona que ha hecho que esta tesis sea posible: gracias Chavela. Gracias por confiar en mí cada día, por tener paciencia, por enseñarme y por hacer de mí una mejor profesional. Nunca olvidaré estos años en el laboratorio 412, un laboratorio que creaste tú y que me ha permitido, no solamente avanzar en mi carrera, sino avanzar como persona. Porque aunque, como buena jefa y becaria, hemos tenido nuestras discusiones, siempre has sabido entenderme y apoyarme. Gracias por cada día de estos últimos años, gracias.

Después de ella tiene que venir Javier, porque con él empecé y fue el primero en hablarme de las moscas. Porque una vez que dejó de ser mi profesor empezó a ser mi compañero, mi amigo, una persona con la que

podía contar ya fuese para hablar de bioinformática, dominios y moscas como para compartir un gin-tonic, una buena cena o unas cañas en cualquier lado. La verdad, no sé qué agradecerte más, el haberte conocido como mi maestro o como mi compañero, has sido tan bueno en las dos cosas que me costaría mucho elegir. Por eso, gracias por todo.

Laura, muchas gracias por ser mi amiga, porque al final, aunque te puedo agradecer ser una buena compañera, una gran profesional y una gran guía, lo que más te agradezco son los momentos de risas y lágrimas. Los pitis en la azotea, los saltos delante del marcador de RNA, los cafés en la pérgola... eso hizo que llegar a un sitio nuevo fuese como llegar a casa. Muchísimas gracias.

César, porque al final has sido un segundo jefe para mi, porque cuando he tenido una pregunta te has volcado en buscarme soluciones. Por los consejos, tanto profesionales como personales, siempre has tenido una palabra de apoyo, a veces de consuelo, a veces de pura comprensión. Aunque no lo ponga en ningún sitio, tu también has formado parte de esta tesis y siempre te estaré agradecida por ello.

Elena, si es que no puedo decirte nada. Han sido tantas horas, tantos ratos, tantos pequeños momentos... Un laboratorio sin ti va a ser una tortura ¿Quién va a gritar "Evaaaaaa" llena de frustración en mi próximo laboratorio? Ya ves, hasta eso lo echo de menos ahora que no estoy allí. Gracias por los quesos, los embutidos y todas las cosas ricas que me has traído siempre que has podido, gracias por las risas a las nueve de la noche en la puerta del CBM cuando ya no sabíamos si reír o llorar. Pero sobre todo gracias por ser tú, porque siempre has sido un apoyo, todas las veces que he estado desmoralizada y sin saber qué hacer has estado a mi lado, muchas gracias.

Gracias a todos los que habéis pasado por el 412, porque ahora que mi tiempo allí se acaba me acuerdo de cada uno de vosotros y me doy cuenta de lo mucho que me habéis enseñado. Dani, Amparo, Vanessa... unos más conmigo otros más con Elena, pero al final todos habéis sido grandes compañeros y grandes maestros. Quizá no lo sabéis, pero me ha alegrado mucho que hayáis formado parte de este proyecto que ha sido mi

tesis, ya sea desde un punto científico o personal. Ha sido genial compartir laboratorio con vosotros.

Ahora me voy directa al final del pasillo, al 420, a agradecerse tanto a los que están como a los que ya se han ido. Ese laboratorio al que he corrido con millones de preguntas y millones de peticiones a lo largo de estos últimos años. Siempre ha habido alguien dispuesto a ayudarme y a enseñarme. Siempre he tenido palabras de apoyo y de comprensión cuando las he necesitado. Buenos consejos y desde luego, grandes compañeros. Porque a veces agradecemos el apoyo en los momentos duros, pero también os tengo que agradecer las risas y los cafés, que sin ellos estos años no habrían sido ni una cuarta parte de lo que han llegado a ser.

Gracias Natalia, Antonio y Álvaro por vuestros consejos con cultivos celulares y proteínas, que al final en la tesis no parece que haya sido mucho, pero yo sé que os he tendido meses mareados con ello. Estuvisteis los tres espectaculares y sin duda habéis sido grandes profesores.

Gracias Esther, Sonia, Anabel, Sandra, Marta y una vez más Álvaro. A unos por los cafés, esos que ya he dicho que han sido esenciales, a otros por las risas y las charlas en las comidas. Bueno, y a Charo, que aunque no comía con nosotros, siempre que hemos tenido algo que celebrar ella ha sido la primera en disfrutar como una más. Porque al final esos pequeños momentos con todo el 420, han hecho que los días sean mil veces más divertidos. Habéis hecho de nuestro trabajo un sitio donde cualquiera querría ir cada día.

Sonsoles y Mar, mis jefas adoptivas. Gracias sobre todo por este último año y medio, gracias a vosotras hemos podido sacar los últimos experimentos de la tesis. Al final, aunque estamos al otro lado del pasillo, gracias a vosotras y a Chavela, he sentido que el 420 y el 412 eran un laboratorio. Gracias por preocuparos por mí como una más de vuestro equipo. Sin duda alguna, las tres jefas sois un modelo a seguir, tanto de sabiduría como de humanidad.

Gracias al laboratorio 421, a cada una de las personas que están allí. Creo que nunca me he tomado un café con ninguno, pero cada vez que he entrado a pedir un favor todos y cada uno se han preocupado por ayudarme,

explicarme, prestarme... de todo, muchísimas gracias. Y bueno, al jefe, que Jose Félix ha sido, desde el primer día, el jefe más enrollado que he visto en todo el CBM. Gracias por las risas, por los consejos y por tener siempre una palabra amable.

Para acabar con la parte científica de los agradecimientos, quiero agradecer a cada persona que ha enriquecido esta tesis, tanto las cosas que salen como las que no salen. Porque al final, he tenido la suerte de aprender de muchas personas, todas ellas grandes profesionales. Gracias a Ruth, porque aunque al final el pollo no salió adelante, fue un gran aprendizaje. Gracias a Marta, porque con el ratón, dadas las circunstancias, no pude terminar, pero me diste no sólo unos días geniales de aprendizaje sino además un contacto que hasta ahora te agradezco: María. A JL Lázaro, el gurú de las proteínas, porque aprender de un maestro como tu no tiene precio. Tus protocolos los guardaré hasta el último día que pase en un laboratorio. Al grupo de María Gómez, porque gracias a vosotros he entrado en el mundo de las qPCR, es mérito vuestro cada apartado en el que sale esa técnica, habéis tenido tanta paciencia... El tiempo que pasé con vosotros al final, fue como tener otro laboratorio adoptivo. Y por supuesto a Alberto, que me introdujo al maravilloso mundo de la estadística... Gracias, creo que sin el t-test no paramétrico, no sería la misma.

Pero estos años no sólo ha sido el CBM. Estos años no han sido sólo estos años.

Gracias a mis padres, porque ellos han creído en mi incluso cuando yo no lo hacía. No sé como he podido tener la suerte tenerlos como padres, desde la primera vez que os dije que me quería dedicar a la ciencia hasta hoy que estoy terminando de escribir mi tesis habéis creído en mi. Mamá, Papá, sois los mejores, gracias por todo lo que habéis hecho por mi, estos años y toda mi vida. Os quiero.

A Trilce, porque desde siempre has sido una parte de mi. Porque apuestas por mi cada día, porque confías en mi, porque sin ti mi vida no sería, porque nadie puede soñar con tener todo lo que me das.

A Silvia y a Óscar, mis hermanos mayores. Los mejores hermanos mayores que pueda soñar. Porque al final, en estos últimos años habéis

formado parte de este proyecto, con vuestras preguntas, con vuestros consejos y sobre todo con vuestra presencia, no me habéis faltado nunca. Gracias.

A mi otra familia, Miriam, Sara, Pilar y Javi, porque no habéis entrado nunca en un laboratorio, pero cada vez que he necesitado desahogarme me habéis escuchado y sobre todo, me habéis llevado de fiesta. Gracias, sin esos rones con Coca Cola es muy posible que no hubiese llegado cuerda hasta aquí. Sois los mejores.

A mis otros compañeros Víctor, Eli, Eli, Mary, Violeta y Bea, porque aunque pasé de veros cada día a veros una vez cada mil años (es lo que tiene dedicarse a esto) aún estáis ahí. Cada vez que os veo seguís siendo los mismos que dejé el último día de Universidad pero en una versión mejorada. Gracias por los consejos, por los hombros en los que he llorado, por las risas, por los viajes... gracias por seguir siendo.

A José, mi marido, mi amigo, mi compañero... Gracias por apoyarme en mi camino, porque has estado a mi lado en cada lágrima y en cada sonrisa, porque si no llega a ser por ti hoy no estaría aquí sentada agradeciéndoselo a todo el mundo. Gracias por creer en nuestro proyecto y hacerlo posible cada día, gracias por estar siempre dispuesto a todo con tal de ayudarme. Gracias.

Estoy segura de que me dejo a alguien, pero ya son cuatro hojas y no creo que nadie aguante tanto leyendo agradecimientos... Pero si me dejo a alguien quiero que sepa que es más por el momento que por no estar agradecida, han sido unos años muy intensos y mucha gente ha sido genial conmigo, he tenido muchísima suerte al encontrarme a personas tan maravillosas en mi camino.

Gracias a todas y cada una de las personas que han formado parte de este proyecto que ha sido mi tesis, que no son sólo los experimentos y la parte científica, sino la parte personal.

Gracias.



# ÍNDICE

---

AGRADECIMIENTOS	1
-----------------	---

---

RESUMEN / ABSTRACT	13
--------------------	----

---

INTRODUCCIÓN	19
--------------	----

---

1. Desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i>	22
2. Desarrollo del disco imaginal de ala	22
2.1 Especificación de los eje antero-posterior y proximo-distal	24
2.2 Especificación del eje proximo-distal	25
3. La Polaridad Planar Celular	26
3.1 La vía de Frizzled/Flamingo	27
3.2 La vía de Fat/Dachsous	28
3.3 Relación de Fat y Dachsous con la vía de Hippo	29
3.4. Caracterización molecular del gen <i>dachsous</i>	30
4. Otros modelos para el estudio de la polaridad planar celular en vertebrados	31

OBJETIVOS	37
-----------	----

---

RESULTADOS	41
------------	----

---

1. Antecedentes	43
2. Caracterización molecular de <i>dachsous</i>	45
2.1 Análisis de la expresión de <i>dachsous</i> mediante northern blot	45
2.2 Análisis transcripcional de <i>ds</i> mediante RT-qPCR	46
2.3 Análisis transcripcional por RT-qPCR de diferentes alelos <i>dachsous</i>	47
2.4 Distribución espacial y localización subcelular de la proteína Dachsous	47
2.5 Detección de las proteínas Dachsous	49
2.6 Estructura molecular de las isoformas transcripcionales de <i>dachsous</i>	50
2.7 Análisis fenotípico de la sobreexpresión de diferentes ARNs interferentes	52
2.8 Cuantificación de la expresión de <i>dachsous</i> en condiciones de interferencia	53

2.9 Análisis fenotípico de la sobreexpresión de las isoformas descritas de Dachsous	54
2.10 Regulación espacio-temporal de Dachsous	57
3. Análisis funcional de los dominios conservados en la región citoplasmática de Dachsous	60
3.1 Análisis fenotípico de la sobreexpresión de las formas DsICA	60
3.2 Fosforilación de la región citoplasmática de Dachsous	63
4. Estudio de interacciones genéticas de la proteína Dachsous con nuevos genes candidatos	64
4.1 Interacción genética entre <i>dachsous</i> y el gen <i>arc</i>	65
4.2 Interacción genética entre <i>dachsous</i> y <i>dishevelled</i>	66
4.3 Interacción genética entre <i>dachsous</i> y <i>nemo</i>	67
5. Homólogos del gen <i>dachsous</i> en el ratón	68
5.1 Análisis transcripcional	69
5.2 Análisis por northern blot de <i>dachsous1</i> y <i>dachsous2</i> en el oído interno de ratón	70
5.3 Homología funcional de las regiones citoplasmáticas de Dachsous, Dachsous1 y Dachsous2	71
6. Función de Dachsous en el desarrollo del órgano de Johnston	72
6.1 Alteraciones de la antena y el órgano de Johnston en mutantes <i>dachsous</i>	74
6.2 Función de <i>dachsous</i> en la formación de los órganos cordotonaes	75
6.3 Dachsous en la formación de los elementos cuticulares del órgano de Johnston	75
6.4 Interacción entre <i>dachsous</i> y la vía de Notch	76

## DISCUSIÓN 79

La compleja regulación del locus de <i>dachsous</i>	82
Relevancia funcionalidad de las distintas isoformas de Dachsous	84
Dominios de la región citoplasmática y nuevos componentes que participan en la polaridad planar celular y la proliferación celular	85
Importancia funcional de la localización subcelular de Dachsous	86
Función de Dachsous en la formación del órgano de Johnston	86



1. Herramientas genéticas	97
1.1 Estirpes de <i>Drosophila melanogaster</i>	97
1.2 Obtención de moscas transgénicas	98
1.3 Análisis de sobreexpresión mediante el sistema Gal4/UAS	99
1.4 Análisis clonal	99
1.5 Inmunohistoquímica de los discos imaginales	99
1.6 Adquisición y tratamiento de imágenes	100
1.7 Disección de los órganos de ratón en diferentes estadios del desarrollo	100
1.8 Montaje y medición de alas	100
2. Biología Molecular, celular y Bioquímica	101
2.1 Extracción de ARN a partir de tejidos	101
2.2 Análisis mediante PCR de retrotranscripción (RT-PCR)	102
2.3 Síntesis de sondas de ARN marcadas con digoxigenina	102
2.4 Análisis por la técnica de northern blot	103
2.5 Clonajes para la generación de líneas transgénicas de <i>Drosophila</i>	103
2.6 Mutagénesis mediante el método SOEing-PCR	104
2.7 Obtención de ADN a partir de cultivos bacterianos	105
2.8 Secuenciación de los fragmentos de ADN	105
2.9 Determinación de los extremos 5' y 3' del ADNc mediante la técnica RACE	105
2.10 Análisis por PCR cuantitativa (RT-qPCR)	106
2.11 Extracción de proteínas	107
2.12 Análisis por la técnica de western blot	107
2.13 Cultivos celulares	108
2.14 Inmunoprecipitación	108
2.15 Generación del anticuerpo policlonal de Dachous	109

<b>ANEXO</b>	<b>113</b>
--------------	------------

---

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>121</b>
---------------------	------------

---

<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>129</b>
---------------------	------------

---

---





## RESUMEN / ABSTRACT





La Polaridad Planar Celular (PPC) es un mecanismo evolutivamente conservado que inicialmente fue caracterizado en *Drosophila melanogaster* y participa en la organización tridimensional de los tejidos. Las caderinas atípicas son componentes esenciales en este proceso. En esta tesis nos hemos centrado en el estudio de la caderina atípica Dachshous (Ds) de *Drosophila* que participa en la vía Fat/Ds de PPC. Además de esta función, Ds participa en otros procesos durante el desarrollo regulando la proliferación celular a través de la vía de Hippo.

Durante el desarrollo de esta tesis, se ha llevado a cabo un estudio molecular exhaustivo del locus *ds*. Utilizando técnicas moleculares como el northern blot y la RT-qPCR se ha podido demostrar la existencia de diferentes isoformas transcripcionales, y conocer la composición exónica de algunas de ellas. Con un nuevo anticuerpo, hemos detectado nuevas proteínas Ds mediante western blot y analizando la localización subcelular de estas en los discos imaginales. También hemos analizado la función de las isoformas solubles DsEx y DsIntra, sin dominio transmembrana y compuestas por la región extracelular y la región citoplasmática respectivamente. El análisis genético de falta de función y/o sobreexpresión de las mencionadas isoformas revelan un papel esencial de la región citoplasmática tanto para la actividad de Ds en PPC como en el control de la proliferación celular.

Por último, hemos mostrado por primera vez que el mecanismo de PPC, a través de la proteína Ds, actúa durante el desarrollo del órgano de Johnston (OJ), el órgano auditivo de *Drosophila melanogaster*. Estos experimentos preliminares muestran que la PPC, como mecanismo evolutivamente conservado, participa en la formación del sistema auditivo de diferentes organismos. Esto, permitirá utilizar a *Drosophila* como modelo para identificar nuevos genes relacionados con sorderas hereditarias en humanos.





The Planar Cell Polarity (PCP) is an evolutionary conserved mechanism initially characterized in *Drosophila melanogaster*. PCP is required for the three-dimensional organization of the tissues to form organs and the atypical cadherins play an essential role in this process. In this experimental work I have focused on the study of the *Drosophila* atypical cadherin Dachsous (Ds). In addition to its role in the Ds/Ft pathway of PPC mechanism, Ds participates in the control of cell proliferation through the modulation of the activity of Hippo pathway.

During the course of producing my doctoral thesis, a comprehensive molecular analysis of the *ds* gene has been carried out using different molecular techniques such as northern blot and RT-qPCR. The results have shown the existence of novel *ds* transcriptional isoforms. The exonic composition of three of those isoforms named DsEx, Ds1 and DsIntra has been determined. The generation of a new Ds antibody has allowed us to detect by western blot some of those Ds isoforms focusing our interest on their subcellular location in the imaginal epithelial cells. Additionally, we have also addressed the functional relevance of the soluble isoforms DsIntra (cytoplasmic region) and DsEx (extracellular region) without a transmembrane domain to be anchored to the cell membrane.

A genetic-molecular analysis using several loss of function conditions as well as the overexpression of different Ds forms has demonstrated an essential role of the cytoplasmic region in the two main developmental functions in which Ds participates: PCP and cell proliferation.

Finally, we have shown the first evidence that suggest a role of Ds and therefore the PCP mechanism during the formation of the *Drosophila* auditory system named the Johnston's organ. These preliminary results suggest that PCP is an evolutionary mechanism involved in the development of the auditory organ from insect to vertebrates. This indicates that *Drosophila* might be an interesting animal model to identify novel genes associated with PCP and hereditary hearing-loss diseases in humans.



## INTRODUCCIÓN

[illegible]

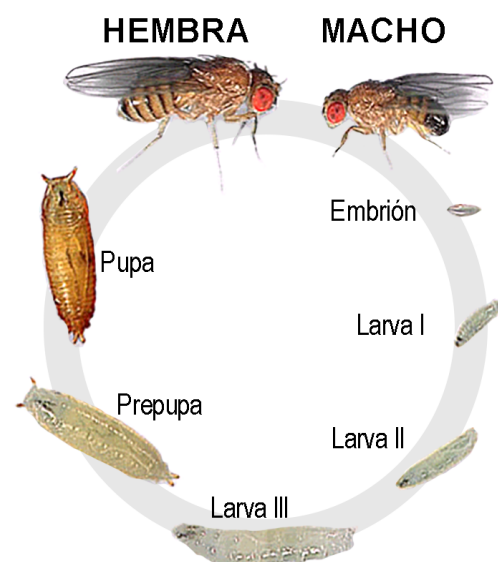




La formación de un organismo multicelular en toda su complejidad se inicia a partir de una sola célula llamada cigoto. Una de las grandes preguntas científicas es la forma en la que este cigoto es capaz de proliferar, diferenciarse y crecer hasta formar un ser completo. La biología del desarrollo, gracias a la incorporación sucesiva de múltiples herramientas, ha logrado desvelar muchas de las claves esenciales a nivel genético y molecular de los procesos implicados en el desarrollo de los seres vivos.

La mayoría de los genes que intervienen durante el desarrollo están conservados evolutivamente. Por ello, se han empleado distintos animales modelo para realizar abordajes, teóricamente más simplificados, que permitan lograr un entendimiento global del desarrollo de un ser vivo.

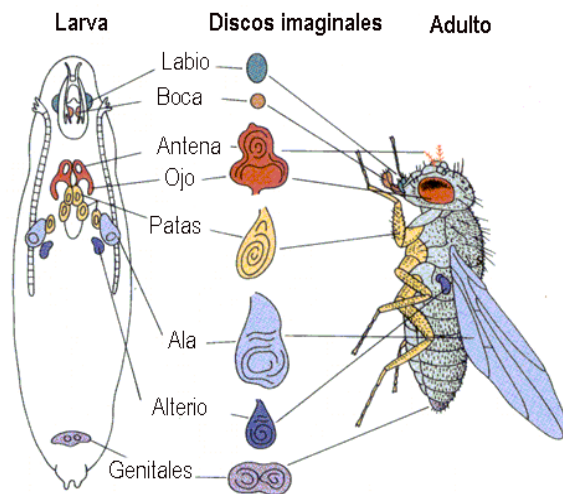
En este trabajo hemos escogido, la mosca *Drosophila melanogaster* como organismo modelo no sólo por su fácil manejo, sino sobre todo por la gran cantidad de herramientas genéticas disponibles para estudiar la morfogénesis.



**Figura I1:** Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Modificada de Gilbert, 2003.

### 1. Desarrollo de *Drosophila melanogaster*

*Drosophila melanogaster* es un insecto holometábolo cuya formación puede dividirse en cuatro etapas diferenciadas. El embrión o huevo eclosiona para dar lugar a la larva. Esta, pasa por tres etapas de muda (larva I, larva II y larva III) durante las cuales tiene lugar el desarrollo de los llamados discos imaginales. Posteriormente, la larva pasa a la fase de pupa en la que tiene lugar la metamorfosis. En la metamorfosis los discos imaginales dan lugar a diferentes estructuras cuticulares del insecto adulto. Durante este proceso se requiere un gran consumo de energía que se obtiene con la eliminación (histólisis) de la mayor parte de los tejidos larvarios (Figura I1)



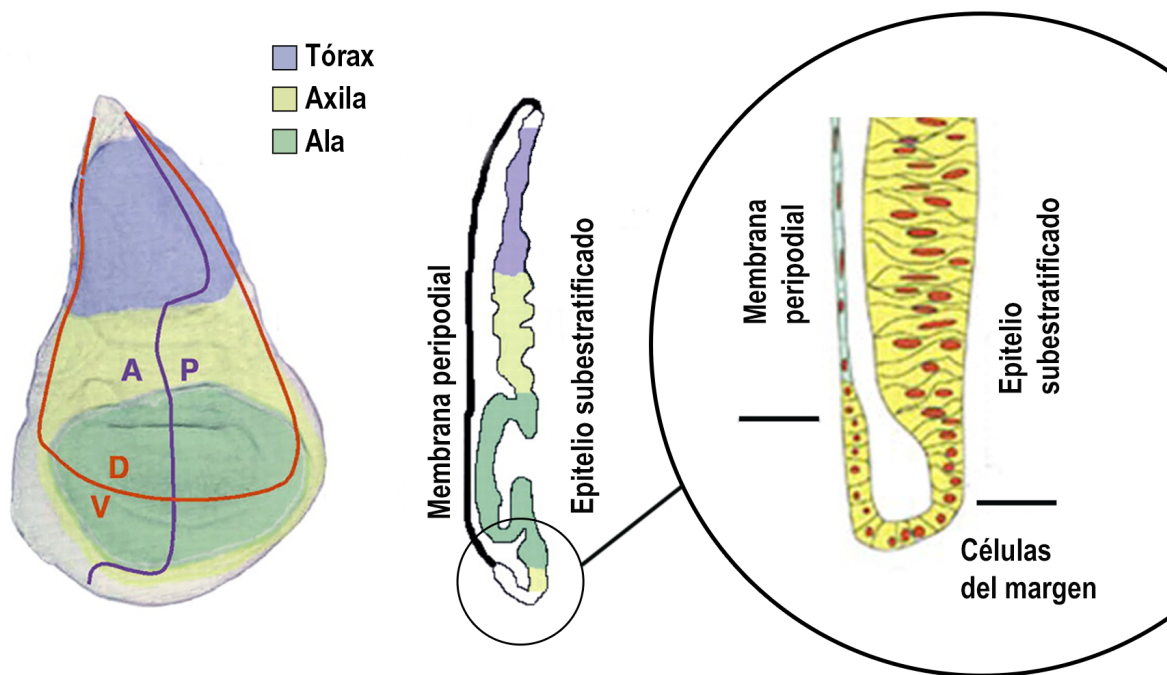
**Figura I2:** Esquema de los discos imaginales y las correspondientes estructuras adultas que forman. Imagen modificada de Mathews, 3ª edición.

Los discos imaginales son estructuras formadas por células epiteliales derivadas del ectodermo embrionario. Durante el estadio larvario tienen lugar de forma simultánea dos procesos: la proliferación celular (con un incremento de  $10^3$  del número de células) y la formación de patrón. En este proceso se especifican los territorios que durante la metamorfosis dan lugar a estructuras adultas tales como cabeza, tórax, alas, patas, genitalia y analia (García-Bellido y Merriam, 1971; revisado en Ashburner, 1989 y en Lawrence, 1992) (Figura I2)

### 2. Desarrollo del disco imaginal de ala

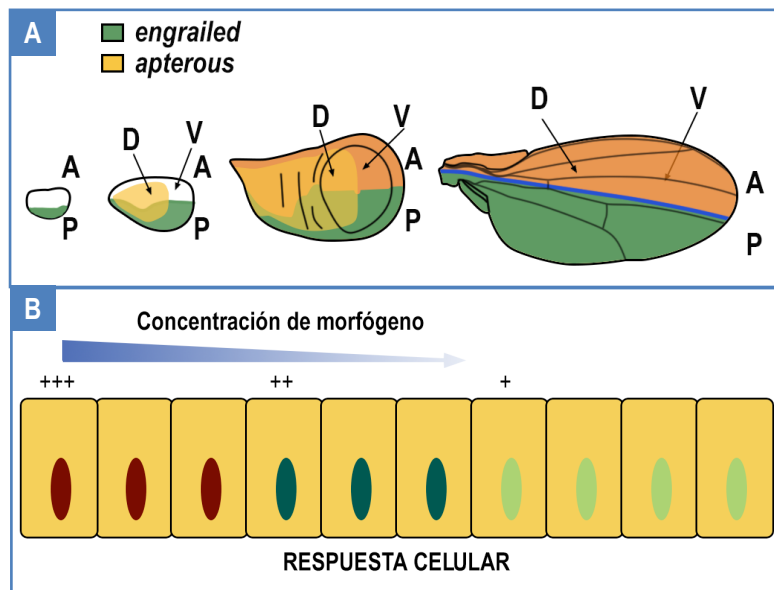
El disco imaginal de ala es el de mayor tamaño y comprende diferentes tipos celulares. Las células del disco propio forman un epitelio subestratificado con una estructura columnar que da lugar al territorio prospectivo del tórax, la axila (zona de unión entre el tórax y el ala) y ala (Figura I3). Envolviendo al disco propio se encuentran unas células escamosas que reciben el nombre de membrana peripodial. Estas células contribuyen muy poco a la formación de la epidermis adulta pero son esenciales para la eversión y el cierre de los discos durante la metamorfosis (Marti-Blanco y cols., 2000, Pastor-Pareja y cols., 2004). Las células que conectan el disco propio y la membrana peripodial se denominan células del margen y presentan una estructura cuboidal. En el insecto adulto estas células dan lugar a la pleura ventral y lateral (Figura I3).

El análisis genético en el disco imaginal de ala como sistema modelo permitió establecer la



**Figura I3:** Mapa de destino y tipos celulares del disco imaginal de ala. Visión frontal del disco imaginal de ala con las zonas presuntivas de ala (verde), axila (amarillo) y tórax (morado). Corte ortogonal del disco de ala en el que se muestra la membrana peripodial y el epitelio subestratificado. Amplificación de la zona de unión entre el disco propio (estructura columnar) y la membrana peripodial (células escamosas) mostrando las células del margen (estructura cuboidal). Imágenes modificadas de Butler, 2003 y Baena-López, 2003.

teoría de los compartimentos (García-Bellido y cols., 1973). Según esta, el disco queda dividido en diferentes poblaciones de células con unas características comunes que se excluyen entre sí. Los compartimentos se definen por la expresión de los denominados genes selectores (Figura I4A), las células que los componen proceden de un mismo linaje y presentan unas propiedades de adhesión características (García-Bellido y cols., 1976). De esta forma, en función de los genes selectores expresados, se producirá una regulación génica específica para cada compartimento. Los bordes de compartimento son bordes de adhesión de mínimo contacto entre poblaciones celulares diferentes (Lawrence y cols., 1992) que actúan como centros organizadores. En los bordes de compartimento se expresan proteínas difusibles denominadas morfógenos. Los morfógenos forman un gradiente y activan diferentes cascadas de transducción de señales que coordinan la proliferación y la diferenciación (especificación de territorios) durante el desarrollo imaginal. El tipo de respuesta celular depende de la distancia (cantidad de morfógeno) a la que se encuentra la célula del centro organizador (Figura I4B) (Irvine y Rauskolb, 2001; Blair, 2003).



**Figura 14:** Especificación de los compartimentos y la respuesta celular a distintas concentraciones de morfógeno. **A)** Desarrollo del disco imaginal de ala de larva I hasta adulto. Marcando los compartimentos Anterior (A), Posterior (P), Dorsal (D) y Ventral (V) y el dominio de expresión de los genes selectores. **B)** Esquema de respuesta celular diferenciada según el gradiente del morfógeno presente. Modificado de Blair, 1995

## 2.1 Especificación de los eje antero-posterior y proximo-distal

El borde A/P se establece por la expresión del gen selector *engrailed* (*en*) en las células que forman el compartimento posterior (P) (Guillen y cols., 1995; Simmonds y cols., 1995; Tabata y cols., 1995). Bajo el control de En, las células del compartimento P sintetizan Hedgehog (Hh) que actúa como un morfógeno de corto alcance activando la expresión de Patched (Ptc) y Decapentaplegic (Dpp) en las células del compartimento anterior (A) de la región central del disco (Eaton y Kornberg, 1990; Tabata 1994; Basler y Struhl, 1994; Capdevilla y Guerrero 1994). Al mismo tiempo, Hh reprime la expresión de *cubitus interruptus* (*ci*) en el compartimento P (Eaton y Kornberg, 1990; Schwartz y cols., 1995).

Dpp es el ortólogo de BMP4 de vertebrados (Padgett y cols., 1987) y actúa como un morfógeno de largo alcance difundiendo a ambos lados del borde A/P. En respuesta a diferentes concentraciones de Dpp, en el disco se activan distintos genes diana como *spalt* (*sal*), *optomotor-blind* (*omb*) y *daughter againts dpp* (*dad*), que codifica una proteína represora de la vía. Por otra parte, también provoca la represión del gen *brinker* (*brk*) un represor de la vía de Dpp. (de Celis y cols., 1996; Grimm y Pflugfelder, 1996; Lecuit y cols., 1996; Inoue y cols., 1998; Minami M y cols., 1999; revisado en Tabata y Takei, 2004) (Figura 15A)

Ortogonal al eje A/P se especifica el eje dorso-ventral (D/V) por la expresión del gen selector *apterous* (*ap*) en las células que van a dar lugar al compartimento dorsal mediante la actividad de la vía de EGF-R (Receptor del factor de crecimiento epidérmico o Epidermal Growth Factor Receptor). La expresión del EGF-R se inicia en la parte proximal del disco (Blair y cols., 1994; Cohen y cols., 1992; Díaz-Benjumea y Cohen, 1993).

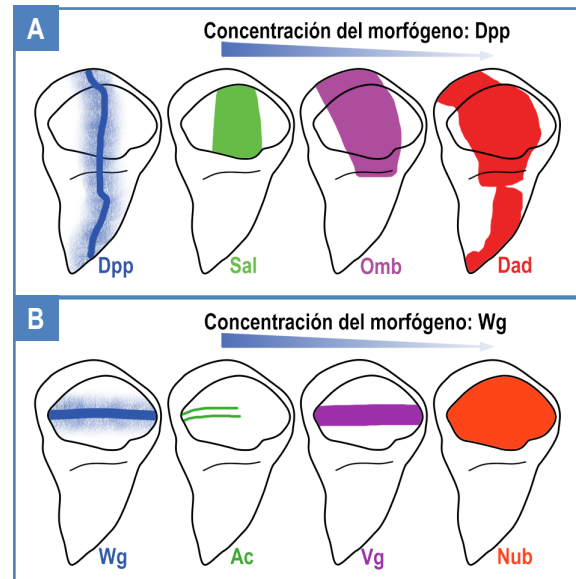
En el borde D/V, la vía de Notch se activa a ambos lados del borde mediante los ligandos



Delta (Dl) y Serrate (Ser) respectivamente y la expresión de la proteína Fringe (Fng) (de Celis y cols., 1996; Díaz-Benjumea y Cohen, 1995; Doherty y cols., 1996; Irvine y Wieschaus, 1994; Milan y Cohen, 2000). En las células dorsales (D) del borde, la expresión de Fng provoca la activación del receptor Notch por la proteína Dl (Fleming y cols., 1997; Panin y cols., 1997) que se expresa en las células ventrales (V) (Fleming y cols., 1997; Panin y cols., 1997). Por el contrario, en las células V del borde, el receptor Notch es activado por el ligando Ser.

Las células del borde organizador D/V expresan Wingless (Wg), un morfógeno de largo alcance que regula la proliferación celular (Neumann y Cohen, 1997; Zecca y cols., 1996).

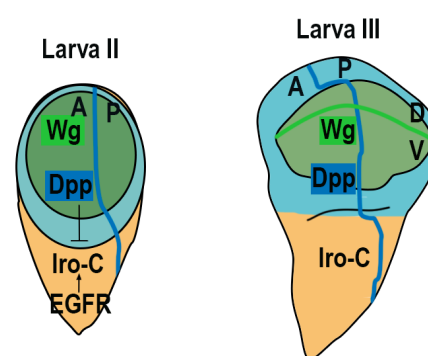
La combinación de Notch y Wg es esencial para la especificación del margen del ala que transcurre a lo largo del borde D/V (Couso y cols., 1994; Phillips y Whittle, 1993; Whitworth y Russell, 2003) (Figura I5B). El gradiente de Wg activa en diferentes dominios Vestigial (Vg) y Nubbin (Nub), ambos esenciales para delimitar el territorio de ala y reprimir el gen *teashirt* (*tsh*).



**Figura I5:** Esquema de los genes activados por el gradiente de Dpp y Wg en el disco imaginal de ala. **A)** Expresión de Dpp en el borde A/P y de los genes diana activados en respuesta al gradiente de Dpp. **B)** Expresión de Wg en el borde D/V y de los genes diana activados en función de la concentración de Wg.

## 2.2 Especificación del eje proximo-distal

La especificación del eje proximo distal (P/D) tiene lugar en paralelo con los dos anteriores. Se inicia en etapas tempranas del estadio larvario con la expresión de Wg en la región anterior-distal (Couso y cols., 1993; Ng y cols., 1996) y la expresión de la vía de EGF-R en la región proximal-dorsal del disco imaginal de ala por el ligando Vein (Vn) (Simcox y cols., 1996; Díez del Corral, 1999). Esta activación simultánea y antagónica define dos nuevos territorios dentro del disco mediante la expresión de Nub y el



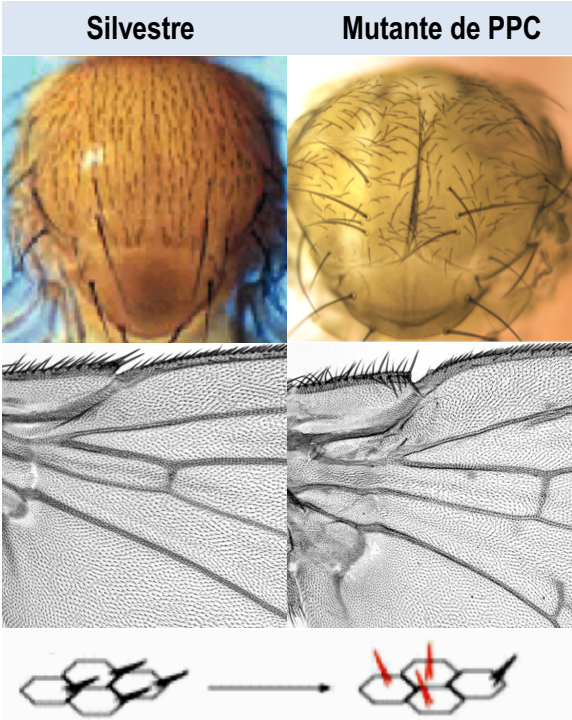
**Figura I6:** Especificación del eje próximo-distal (P/D) en el disco imaginal de ala. La activación de las vías de EGFR y Wg en dominios opuestos determinan la especificación de los territorios de notum (EGFR, Iro-C) y ala (Wg) entre los estadios de larva II y larva III. Modificado de Gómez-Skarmeta, 2003.

complejo génico *iroquois* (*Iro-C*) que darán lugar al ala (expresión de *Wg*) y al notum respectivamente (Wang, SL y cols., 2000; Zecca y Struhl, 2002a; Zecca y Struhl, 2002b). La especificación del territorio que conecta el ala y el tórax (denominado axila o *hinge*) depende de la activación por *Wg* de los genes *zinc finger homology-2* (*zfh-2*) y *homothorax* (*hth*) en ese territorio (Couso y cols., 1994; Phillips y Whittle, 1993; Whitworth y Russell, 2003).

En este proceso no existe una restricción de linaje entre las células que forman los diferentes territorios. (Figura I6) (Revisado en Dekanty y Milan, 2011)

### 3. La Polaridad Planar Celular

La polaridad planar celular (PPC) es un mecanismo que añade un nivel adicional de organización de las células, durante la formación de estructuras en tres dimensiones como son los órganos y tejidos de los animales pluricelulares (Adler, 2002). La señal de polarización que participa en este mecanismo es ortogonal al plano apico-basal de las células y tanto los componentes como el mecanismo están evolutivamente conservados. En vertebrados, la PPC opera en diferentes contextos regulando una gran variedad de procesos, como la extensión convergente, necesaria para la formación del tubo neural (Heisenberg y cols., 2000; Wallingford y cols., 2000), la migración celular, la asimetría izquierda- derecha, la ciliogénesis (Guo y cols., 2004, Mitchell y cols., 2009) o la guía de los axones en el sistema nervioso (revisado en Goodrich y Strutt, 2011; Simons y Mlodzik, 2008).



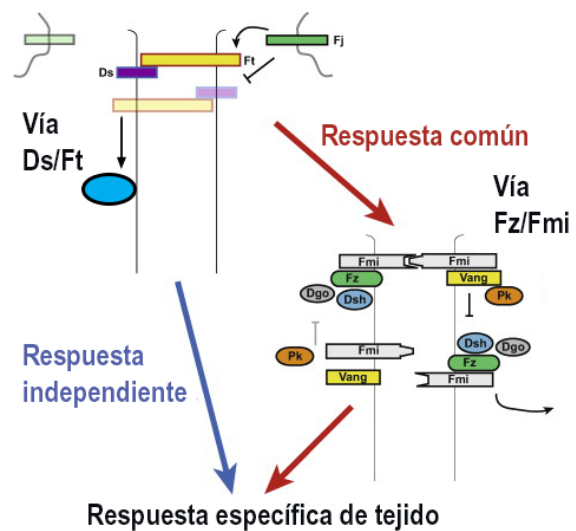
**Figura I7:** Alteraciones de la PPC en el torax y ala de *Drosophila*. Esquema de la disposición de los tricomas en el ala.

Los defectos en PPC están asociados con anomalías en el desarrollo y diferentes enfermedades en seres humanos.

El mecanismo de la PPC fue caracterizado inicialmente en insectos, específicamente en *Drosophila melanogaster*. La primera descripción de este mecanismo se realizó analizando los órganos sensoriales y los tricomas que tapizan el ala del insecto adulto (Figura I7). Estos, presentan

una orientación y una disposición espacial bien definidas y conservadas en el espacio (Gubb y García-Bellido, 1982).

Los estudios genéticos y moleculares han permitido definir dos vías de señalización bien diferenciadas que contribuyen al mantenimiento de la PPC: Frizzled (Fz)/Flamingo (Fmi) y Dachshous(Ds)/Fat(Ft) (revisado en SinghJ y Mlodzik, 2012; Lawrence y cols., 2007) (Figura I8). Ambas vías, mediante un mecanismo no suficientemente conocido hasta el momento, coordinan la propagación de la señal polarizante generando asimetrías locales mediante la interacción entre células vecinas. En ambas vías,



**Figura I8:** Las dos vías de señalización en PPC: Ds/Ft y Fz/Fmi. Según el contexto celular Ds/Ft puede actuar sobre Fz/Fmi o de forma independiente. Modificada de Axelrod, 2009.

la señalización se inicia a través de unas proteínas de membrana denominadas caderinas atípicas (Ft, Ds y Fmi). Este tipo de proteínas presentan diferencias estructurales y funcionales importantes con respecto a las caderinas clásicas. Las diferencias estructurales se localizan en dos regiones: la extracelular y la citoplasmática. Las caderinas atípicas presentan un mayor número de dominios caderina en tándem (de 9 a 34) en la región extracelular, pudiendo incluso presentar otro tipo de motivos (laminina, EGF, etc.), frente a los 5 dominios de las caderinas clásicas. En la región citoplasmática de las caderinas atípicas, el dominio de unión a  $\beta$ -catenina se encuentra dividido en dos y no es funcional por lo que su mecanismo de actuación es distinto. (Revisado en Halbleib y Nelson 2006)

### 3.1 La vía de Frizzled/Flamingo

Esta vía de señalización, también conocida como módulo local, se inicia con dos proteínas de membrana: el receptor Fz, con siete dominios transmembrana, que participa también en la vía canónica de Wg (Moon y cols., 2002) y la caderina atípica Fmi o Starry night (Stan) que a diferencia de otras caderinas atípicas tiene siete dominios transmembrana en lugar de uno (Chae y cols., 1999; Usui y cols., 1999). Otros componentes conocidos son las proteínas Van Gogh (Vang o Strabismus) (Taylor, y cols., 1998; Wolff y cols., 1998), Dishevelled (Dsh) (Krasnow y cols., 1995), Prickle (Pk) (Gubb y cols., 1999) y Diego (Dgo) (Feiguin y cols., 2001). En respuesta a la señal polarizante, estas proteínas son reclutadas en dos complejos proteicos distintos. La localización asimétrica de estas proteínas a lo largo del eje distal y proximal de la membrana celular es esencial para el mantenimiento de la

polaridad. El complejo formado por, Fmi, Fz, Dsh y Dgo se concentra preferentemente en la región distal (donde se formará el tricoma) mientras que el complejo formado por Fmi, Vang y Pk lo harán en la región proximal (Figura I8)(revisado en Seifert y Mlodzik 2007; Thomas y Strutt, 2011; Adler, 2012).

### 3.2 La vía de Fat/Dachsous

Esta otra vía, también conocida como módulo global, contiene las caderinas Fat (Ft) (Mahoney y cols., 1991) y Dachsous (Ds) (Clark y cols., 1995) y la proteína Four-jointed (Fj), con actividad quinasa (Figura I8) (Villano y Kartz 1995; Ishikawa y cols., 2008). El modelo actual de funcionamiento de esta vía se basa en la expresión en gradientes opuestos de Ds y Fj y la formación de heterodímeros entre Ds y Ft en la región apical de células adyacentes (Yang y cols., 2002, Ma y cols., 2003). La fosforilación de las regiones extracelulares de Ds y Ft por Fj modula la capacidad de interacción entre ambas caderinas (Brittle y cols., 2010).

Otros componentes de la vía son Atrophin (o Grunge, Fanto y cols. 2003), Lowfat (Lft; Mao y cols., 2009) que interaccionan con la región citoplasmática de Ft y la miosina tipo VII, Dachs (D) que lo hace con la región citoplasmática de Ds (Mao y cols., 2006; Bosveld y cols., 2012; Matis y Axelrod 2013). Al contrario que Ft y Ds, la localización celular de D es asimétrica en respuesta a la señal polarizante (Rogulja y cols., 2008; Bosveld y cols., 2012; Ambegaonkar y cols., 2013). Sorprendentemente, los defectos de la PPC observados en los mutantes *atro*, *lft* y *d* son muy débiles comparados con los mutantes *ds* y *ft*.

La señal polarizante resultante de la combinación de gradientes y de la interacción entre heterodímeros proporcionaría información a las células para regular su orientación de acuerdo con el entorno en el que se encuentran. Durante mucho tiempo se ha considerado a Ds un ligando de Ft dando sólo relevancia funcional a la región extracelular. Sin embargo, resultados obtenidos en diferentes estudios genéticos, sugieren que además Ds estaría haciendo otras funciones independientes de Ft en las que la región citoplasmática de Ds es esencial aunque el mecanismo de acción es desconocido (Matakatsu y Blair, 2006; Baena-López y cols., 2008; Rogulja y cols., 2008; Matakatsu y Blair, 2012).

El mecanismo para producir una señal polarizante global y la conexión entre vías sigue sin conocerse bien (Strutt y Strutt, 2002; Ma y cols., 2003; Matis y Axelrod, 2013).

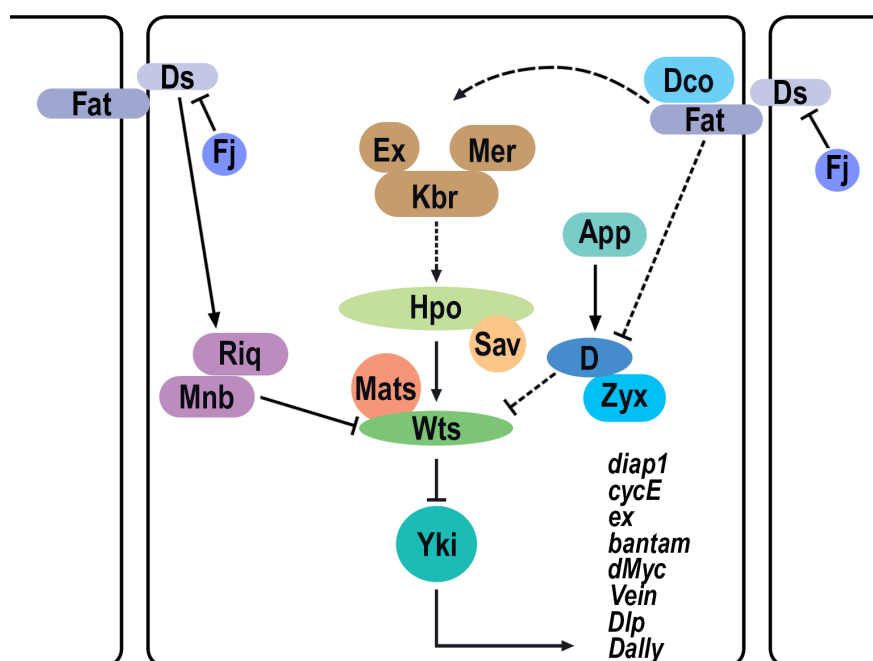
Actualmente existe debate sobre si las vías de Ft/Ds y Fz/Fmi actúan en paralelo (Lawrence 2007) o si Ft/Ds regula la vía de Fz/Fmi (Yang y cols., 2002). Los resultados obtenidos dependen del tejido utilizado para el estudio (abdomen frente a ojo) lo que sugiere una plasticidad del mecanismo de PPC dependiente del contexto celular. Ds y Ft, al contrario que la vía de Fz/Fmi, regulan también otros procesos que tienen lugar en etapas tempranas del desarrollo imaginal como son orientación de

la división celular la proliferación y la morfogénesis (Garoia y cols., 2000; Rodríguez, 2004; Willecke y cols., 2006; Baena-López y cols., 2008; Cho y cols., 2006, Saucedo y Edgard, 2007; Pan y cols., 2007; Baena-López y cols., 2005). En tejidos mutantes para *ds* y *ft* se observa proliferación excesiva y alteraciones en la especificación de los diferentes territorios que derivan de los discos imaginales.

### 3.3 Relación de Fat y Dachous con la vía de Hippo

Inicialmente, Ds y Ft fueron identificados como supresores tumorales y su función en la PPC se describió posteriormente. La regulación de la proliferación y la morfogénesis tiene lugar a través de la vía de Hippo (Figura I9)(Saucedo y Edgard, 2007; Pan y cols., 2007). La activación de la vía de Hippo, provoca la fosforilación del coactivador transcripcional Yorkie (Yki) a través de una serie de quinasas como Hippo (Hpo), Salvador (Sav) y Warts (Wts) que impiden su translocación al núcleo. En condiciones mutantes, la cascada de fosforilación está reprimida y la proteína Yki no fosforilada se acumulará en el núcleo (Dong y cols., 2007; Oh e Irvine, 2008) provocando la activación de genes implicados en proliferación, como bantam, ciclina E y el inhibidor de muerte celular *diap-1* (Saucedo, 2007; Pan y cols., 2007). Por otra parte, también son regulados por esta vía Expanded (Ex), una proteína con dominio FERM (Feng e Irvine 2007) y los proteoglicanos *división anormalmente retrasada* (*dally*) y *Dally-like protein* (*dlp*) moduladores de la actividad de las vías de señalización de Dpp, Wg y Hh (Baena-López y cols., 2008) (Figura I9).

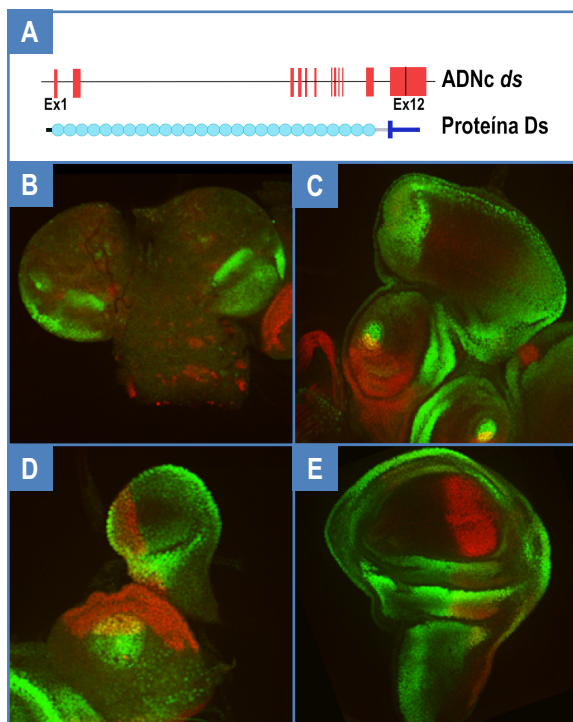
Tanto Ds como Ft están implicados en la regulación de la vía de Hippo (revisado por Staley y



**Figura I9.** Esquema de la vía de Hippo. Se muestran la cascada de quinasas que actúan como componentes conocidos de la vía, los genes efectores y otros reguladores externos y su relación con Ds y Ft. Modificado de Halder y Johnson, 2011.



Irvine, 2012). Hasta la fecha se han realizado diferentes aproximaciones para saber si las funciones de la PPC y la vía de Hippo, son reguladas de forma independiente. Por un lado, estudios funcionales de la región citoplasmática de Ft han permitido identificar varios dominios que participan de forma diferenciada en la regulación de ambas vías (Matakatsu y Blair, 2012; Pan y cols., 2013). Por otro lado, se han identificado nuevos reguladores de la función de Ft, como Zyxin (Zyx), Approximated (App) y la



**Figura I10** Estructura molecular del gen *ds* y su expresión en discos imaginales y cerebro. **A)** Estructura del gen *ds*, mostrando la distribución y tamaño de los 12 exones (cajas rojas). Esquema mostrando los dominios de la proteína Ds: péptido señal (negro), región extracelular (círculos azules), dominio transmembrana y región citoplasmática (azul oscuro). Expresión de Ds en **B)** cerebro y en discos imaginales de **C)** ojo-antena, **D)** pata y **E)** ala.

quinasa Discs Overgrown (Dco) que actúan sobre la vía de Hippo y la PPC aunque se desconoce el mecanismo por el cual llevan a cabo cada una de estas funciones. App actúa como regulador negativo de la señalización de Ft en crecimiento y proliferación (Matakatsu y Blair, 2008) y Zyx a través de su interacción directa con D es capaz de unirse a Wts y provocar su inactivación (Rauskolb y cols., 2011). Dco es capaz de fosforilar la región citoplasmática de Ft siendo esta fosforilación dependiente de Ds (Degoutin y cols., 2013).

Recientemente se han descrito también reguladores de la vía de Hippo que actúan a través de la región citoplasmática de Ds, como Riquiqui (Riq) y Minibrain (Mnb). Riq interacciona físicamente con el dominio citoplasmático de Ds y con la proteína Mnb. El complejo proteico Riq-Mnb fosforila la proteína Wts provocando su inactivación y la consiguiente translocación de Yki al núcleo. En la actualidad, no se ha descrito ninguna función de estas dos proteínas vinculada

con la PPC.

### 3.4. Caracterización molecular del gen *dachsous*

El locus *ds* está situado en el brazo izquierdo del cromosoma 2 y abarca una región genómica de aproximadamente 110 Kb (Clark y cols., 1995). Se ha descrito la expresión de un único ADNc compuesto de 12 exones derivado del solapamiento de pequeños clones procedentes de una genoteca de ADNc de embriones de *Drosophila*. De los 11 intrones, el intrón 2 tiene aproximadamente 40 Kb

(Tabla I1).

Exón	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kb	0,69	1,99	0,67	0,59	0,46	0,51	0,36	0,78	0,41	0,37	1,28	4,25
Intrón	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Kb	6,41	48,48	0,84	0,57	0,95	2,49	0,16	0,10	1,11	2,27	0,12	

**Tabla I1.** Tamaño de los exones e intrones derivados del alineamiento del ADNc embrionario (L08811.2) con el genoma de *Drosophila*.

La proteína Ds propuesta consta de 3503 aminoácidos y consta de una región extracelular con un péptido señal y 27 dominios de tipo caderina organizados en tándem; una región transmembrana y una pequeña región citoplasmática. A diferencia de las caderinas clásicas, el dominio de unión a  $\beta$ -catenina está truncado y por tanto se considera que no es funcional para unir  $\beta$ -catenina.

Ds se expresa en diferentes etapas del desarrollo, desde embrión hasta adulto con un patrón dinámico en el tiempo y restringido espacialmente (Clark y cols., 1995; Rodríguez, 2004; Dearborn y cols., 2004). En larvas de tercer estadio, Ds se expresa mayoritariamente en el cerebro y en los discos imaginales (Figura I10). En el cerebro, se expresa en los lóbulos ópticos y otras regiones (Cuerpo con forma de seta o *mushroom body*) relacionadas con funciones olfativas, de aprendizaje asociado y memoria. En el disco de ala, la expresión de Ds se localiza preferentemente en el territorio de unión entre el ala y el tórax (axila o *hinge*) aunque también se observa expresión en el territorio presuntivo de notum (tórax) y a bajos niveles en la región que va a dar lugar al ala (Rodríguez, 2004). En el disco de ojo-antena, encontramos expresión de Ds se expresa en los territorios presuntivos de la arista y los segmentos primero y segundo de la antena donde tiene lugar la formación del sistema auditivo del insecto adulto denominado órgano de Johnston (OJ) (Todi y cols., 2004).

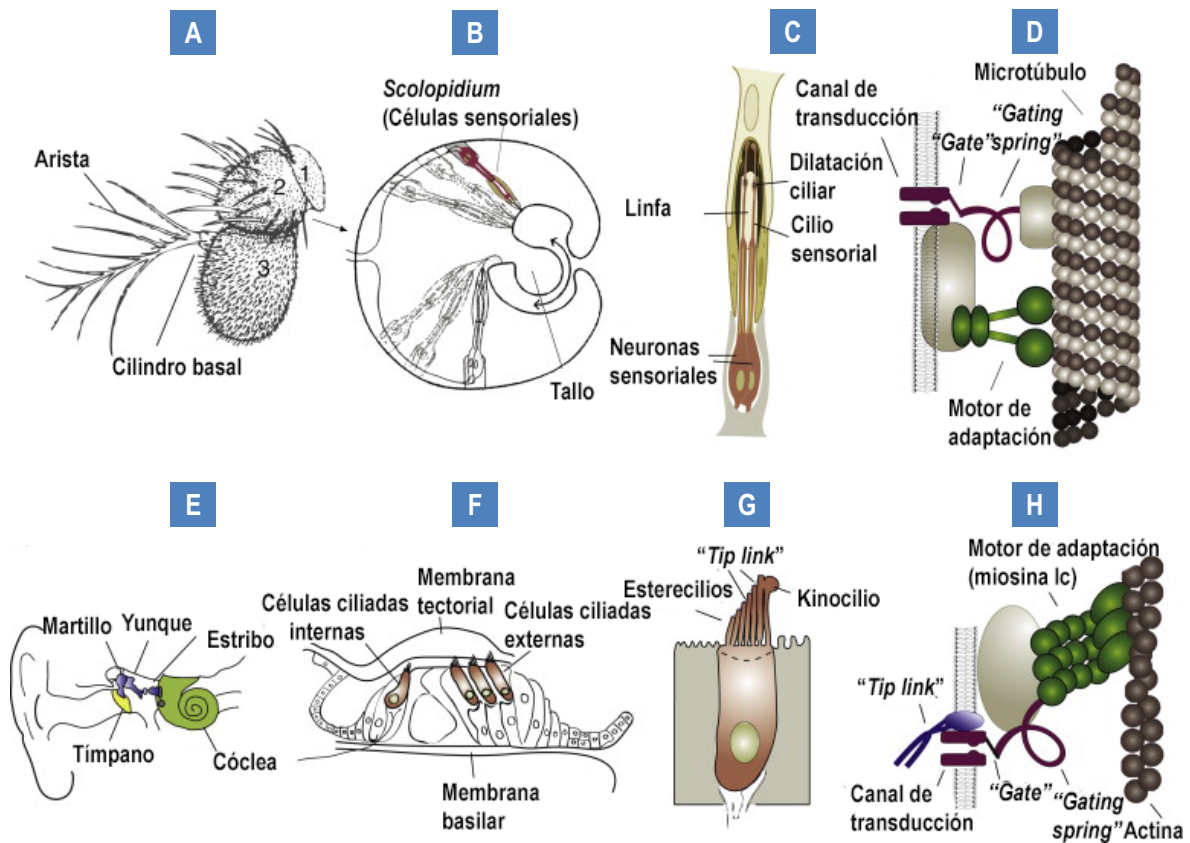
#### 4. Otros modelos para el estudio de la polaridad planar celular en vertebrados

Los primeros estudios genéticos de PPC utilizando como modelo *Drosophila melanogaster* permitieron identificar la mayoría de los genes de la PPC conocidos y proponer un mecanismo de acción. Posteriormente, los estudios de la PPC en vertebrados han mostrado que tanto las proteínas de la PPC como los mecanismos en los que participan están evolutivamente conservados. Los genes de la PPC operan durante el desarrollo en diferentes contextos fisiológicos como la extensión convergente durante la elongación del eje A/P, la ciliogénesis o la polarización de los folículos pilosos (Wallingford y cols., 2012, Simons y Mlodzik, 2008). Los defectos en la PPC son la causa de múltiples

enfermedades y anomalías durante el desarrollo como defectos en el cierre del tubo neural, el riñón poliquístico, las sorderas hereditarias y las malformaciones cardíacas conotruncuales, lo que muestra la importancia de la PPC en el desarrollo de los organismos superiores.

Actualmente, uno de los modelos más empleado para el estudio de la PPC en vertebrados es la formación del oído interno de los mamíferos (Chacon-Heszele y cols., 2009). En la cóclea se encuentra una estructura denominada órgano de Corti, formado por un neuroepitelio de células ciliadas (*hairs*) que en la parte más apical de la membrana despliegan varias profusiones ricas en actina denominadas estereocilios (Wang y cols., 2005)(Figura I11).

La correcta disposición de los estereocilios (formación en forma de V escalonada) es esencial para la transmisión del impulso auditivo. Cuando la vibración del sonido llega a la cóclea la endolinfa,



**Figura I11:** Esquema comparativo de los sistemas auditivos de *Drosophila* y de vertebrados. **A)** Antena de *Drosophila* con los tres segmentos de antenas y la arista. **B)** El órgano de Johnston mostrando las células sensoriales (Scolopium) que lo componen y su anclaje a la estructura cuticular y la unión tarsal a2/a3. **C)** Componentes de la célula sensorial **D)** componentes que participan en la transmisión del impulso nervioso. **E)** Sistema auditivo de vertebrados. **F)** Región del oído interno (órgano de Corti) donde se localizan las células ciliadas **G)** estructura de la célula sensorial y la disposición de los estereocilios en forma de escalera en la región apical **H)** componentes que participan en la transmisión del impulso nervioso. Imagen modificada de Bechstedt y Howard, 2008.



que se encuentra en el interior de la membrana tectorial, ejerce presión sobre los estereocilios desplazándolos. Este movimiento de los estereocilios en la zona apical de la célula sensorial (*hair*) provoca la despolarización de la membrana de forma que el impulso mecánico se transforma en un impulso eléctrico y es transmitido por las neuronas auditivas al cerebro. Las mutaciones en los genes involucrados en la PPC provocan alteraciones en el desarrollo de este órgano, específicamente en la formación de la cóclea y en la orientación de los estereocilios y están relacionadas con sorderas hereditarias (Simons y cols., 2008).

El sistema auditivo de insectos y vertebrados, a pesar de sus diferencias a nivel morfológico, procede de un ancestro común. Esta conservación evolutiva, abarca también a los genes que participan en el proceso de formación y en el mecanismo de transmisión neural (Figura I11).

En *Drosophila*, el sistema auditivo adulto es una estructura interna situada entre los segmentos antenales a2 y a3 que recibe el nombre de órgano de Johnston (OJ) (Todi y cols., 2004). El OJ procede del disco imaginal de ojo-antena y consiste en una cadena de órganos sensoriales especializados que responden a cambios de presión (cordotonaes) y están anclados a la cutícula (Eberl y cols., 2007) (Figura I11).

A continuación se describen algunos de los genes homólogos en ambos organismos:

El gen proneural *atonal* (*ato*) en *Drosophila* y su homólogo *Math1* están implicados en la determinación de las células sensoriales que forman el órgano auditivo: células ciliadas en vertebrados y cordotonaes en *Drosophila* (Bermingham y cols., 1999; Jarman y cols., 1993; Chen y cols., 2002; Bechstedt y Howard y cols., 2008). Ambos pertenecen a la familia de factores de transcripción bHLH.

Los genes implicados en la transmisión neuronal del impulso como *TRIPN1/Non mechanoreceptor potentialC* (*NompC*) miembro de la familia de proteínas formadoras de canales y la miosina VIIA/*crincked* una miosina no convencional, que procura el anclaje entre el canal de transducción y la membrana del estereocilio, también se conservan en ambos organismos.

También existen algunas características funcionales similares como las que se describen a continuación:

- La endolinfa presente en el oído de vertebrados es similar al líquido que rodea al cilio sensorial de *Drosophila*. La composición rica en calcio de este fluido es muy similar en ambos organismos (Göpfert y Robert, 2001; Bechstedt y Howard 2008).
- El proceso activo para la amplificación de la onda sonora a partir de oscilaciones mecánicas. En el caso de *Drosophila* el movimiento de la arista provoca la iniciación de las oscilaciones y la rotación entre los segmentos a2 y a3 de la antena es la encargada de la amplificación. En vertebrados, el tímpano es el receptor del sonido,

y la amplificación se producirá por la vibración de los huesecillos del oído interno y su propagación en forma de ondas en la endolinfa (LeMasurier y Gillespie, 2005; Göpfert y Robert, 2002; Bechstedt y Howard 2008).

El hecho de que existan estas similitudes nos llevó a estudiar la función de la PPC en la formación del OJ. En la sección de resultados de esta tesis se dedica un apartado a describir algunos de los resultados obtenidos hasta el momento.







## OBJETIVO

T  
CA  
CG  
ATA  
TAG  
CAG  
CAAC  
GGAA  
GATG



El punto de partida de esta tesis ha sido resolver las discrepancias existentes entre los datos publicados a nivel molecular y fenotípico del gen *dachsous*. Para ello se han utilizado múltiples herramientas genéticas y moleculares que nos han ayudado a comprender la complejidad funcional de esta proteína. Los objetivos que se han propuesto durante el desarrollo de este trabajo han sido:

1. Estudio molecular del locus *dachsous*.
  - a. Análisis exhaustivo a nivel molecular que incluye el estudio de la expresión transcripcional y de proteína. Determinación de isoformas e identificación de regiones reguladoras.
  - b. Análisis funcional: Estudio *in vivo* de la relevancia funcional de los dominios y algunas de las isoformas de *Dachsous*.
2. Estudio funcional de la región citoplasmática de *Dachsous*.
  - a. Determinación de los dominios conservados mediante un análisis *in silico* y posterior estudio funcional de los mismos durante el desarrollo de los discos imaginales.
  - b. Correlación de los dominios caracterizados con las diferentes funciones de *dachsous* durante el desarrollo del ala.
3. Función del mecanismo de polaridad planar en la formación del sistema auditivo de *Drosophila melanogaster*.
  - a. Función de *dachsous* en la regulación de los genes implicados en la formación del órgano de Johnston





## RESULTADOS

## RESULTADOS



## 1. Antecedentes

Para el estudio de la función de la proteína Dachsous disponemos de diferentes alelos de falta de función descritos en Flybase (ver apartado 1.1 de Materiales y Métodos). Previo al inicio de esta tesis, en el laboratorio, se realizó una seriación alélica de algunos alelos de falta de función *ds* y la caracterización molecular de algunas de estas líneas. De acuerdo a los fenotipos y la viabilidad, los alelos se clasificaron como se indica a continuación:

*ds<sup>1</sup>* y *30A-Gal4* son alelos hipomorfos débiles

*ds<sup>05142</sup>* y *ds<sup>38K</sup>* son alelos hipomorfos fuertes

*ds<sup>36D</sup>* es un alelo hipomorfo nulo

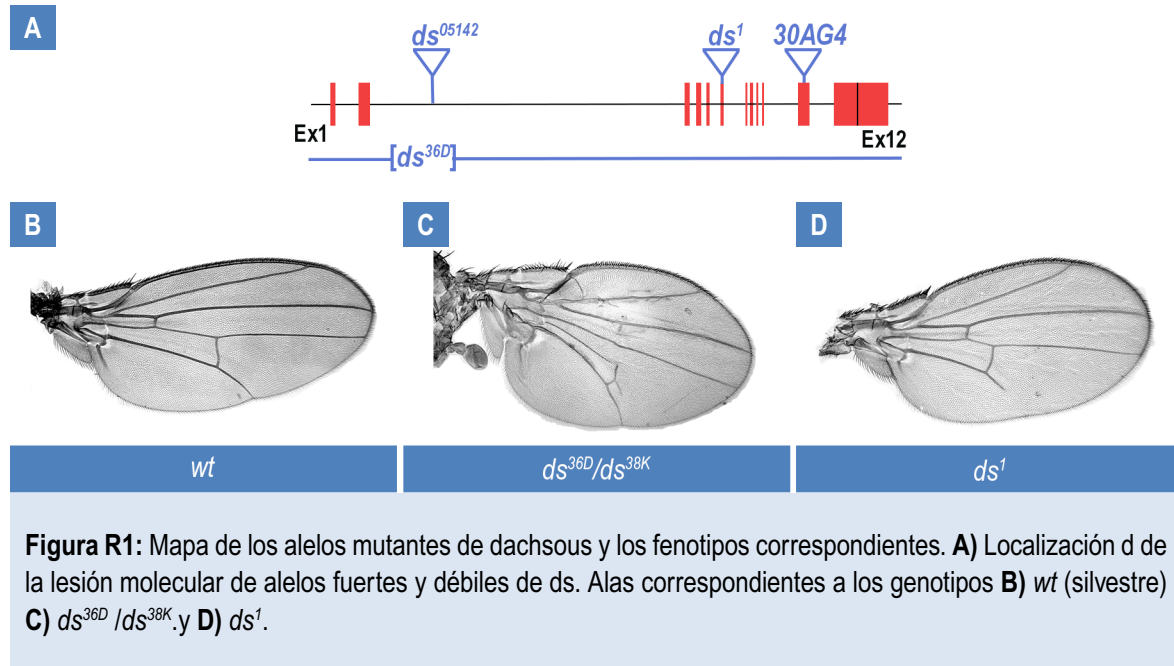
La lesión molecular de *ds<sup>1</sup>* consiste en una inserción en la región 3' del exón 5 del trasposón 412. Esta inserción provoca un *splicing* alternativo, dando lugar a una proteína que pierde 23 aminoácidos del dominio caderina 11 en la región extracelular (Clark y cols., 1995). Por otra parte, *30A-Gal4* es una inserción del elemento Gal4 en el exón 11 que codifica parte de los dominios caderina de la región extracelular de Ds (nuestros datos moleculares; Matakatsu y Blair, 2006).

*ds<sup>05142</sup>* es una inserción de un trasposón PlacZ en el intrón 2 de 42 kb (resultados del laboratorio) mientras que *ds<sup>36D</sup>* es una delección interna procedente de la escisión imprecisa de este trasposón (Rodríguez, 2004). En homocigosis *ds<sup>36D</sup>* es letal embrionario y sólo un porcentaje bajo alcanzan el estadio de larva I.



## RESULTADOS

El alelo  $ds^{38K}$  es una mutación espontánea y se desconoce la lesión molecular que lo causa (<http://flybase.org/reports/FBaI0028156.html>). El análisis por secuenciación realizado en el laboratorio muestra que los exones  $ds^{38K}$  no contienen mutaciones. Por tanto,  $ds^{38K}$ ,  $ds^{05142}$  y  $ds^{36D}$  son alelos reguladores que producen una alteración de la expresión de *dachsous*.



Los fenotipos descritos en alas de individuos mutantes procedentes de diferentes combinaciones alélicas se pueden dividir en tres grandes características:

- **Afectación de la proliferación:** Los discos de ala presentan sobrecrecimiento con respecto a los discos silvestres (*wt*). En individuos adultos la forma del ala es redondeada, pero su aumento de tamaño es muy sutil (Figura R1C). debido al incremento de muerte celular durante la metamorfosis. A veces el ala adulta resultante es incluso de menor tamaño que el ala *wt*. (Clark y cols., 1995, Rodríguez 2004)
- **Alteración del patrón de venas y órganos sensoriales:** El fenotipo es variable en función del alelo utilizado, y va desde aparición de extravenas cerca de la vena L2 a falta parcial o total de las venas ACV y PCV (Figura R1). En el caso del alelo  $ds^1$  falta la parte distal de la vena L5 (Figura R1D). Por otra parte, en alelos débiles o intermedios como  $ds^1$  se observa una disminución de la distancia entre las venas ACV y PCV sobre la vena L4. En las patas los diferentes segmentos

están acortados y las uniones entre los segmentos tarsales están incompletas (agravándose tanto más fuerte sea el alelo) (Clark y cols., 1995, Rodríguez, 2004)

- Afectación de la PPC: En los alelos mutantes de *ds* se observan alteraciones en la orientación de los tricomas (ala) y en el número y disposición de las macro- y microquetas (tórax y abdomen) (Figura I7). (Adler y cols., 1998; Casal y cols., 2002; Ma y cols., 2003) así como en los omatidios (celdas que forman el ojo compuesto del insecto adulto) (Rawls y cols., 2002; Yang y cols., 2002).

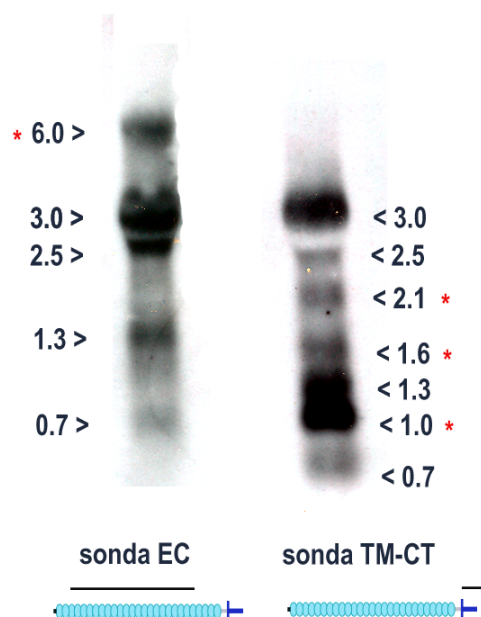
Para poder correlacionar los fenotipos observados con los niveles de expresión de *dachsous* decidimos realizar un análisis de la expresión de *ds* en diferentes condiciones mutantes.

## 2. Caracterización molecular de *dachsous*

### 2.1 Análisis de la expresión de *dachsous* mediante northern blot

La primera aproximación para estudiar los niveles de ARN es la técnica northern blot, usando dos ribosondas diferentes, una que hibrida con la región extracelular (EC) y otra con las regiones citoplasmática y transmembrana (TM-CT) (Figura R2). El ARN total analizado, procede de los tejidos larvarios donde *ds* se expresa preferentemente: los discos imaginales y el cerebro (Fig I10).

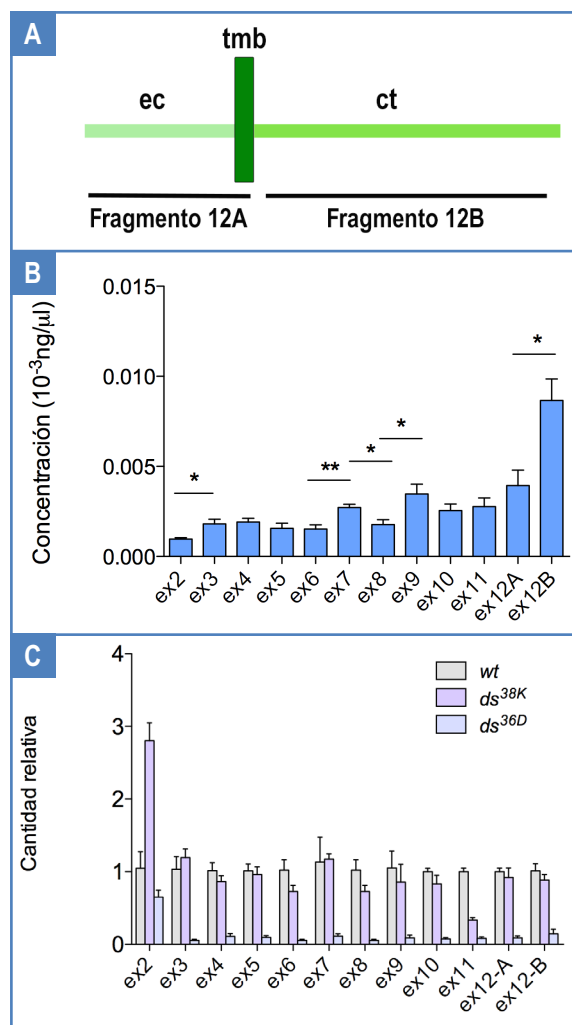
Sorprendentemente, detectamos bandas de ARN diferentes con cada una de las sondas, todas ellas de menos de 12Kb (tamaño descrito para el ADNc embrionario) (Clark, 1995). Algunas bandas, como las de 3, 2.5, 1.3 y 0.7 kb se revelan con las dos sondas, indicando que pese al menor tamaño contienen secuencias de la región citoplasmática y la región extracelular. Sin embargo, encontramos bandas que se detectan únicamente con una de las sondas; como la banda de 6 kb (EC) y las de 1.0, 1.6 y 2.1 kb (TM-CT). Estas últimas, tienen un tamaño inferior a la



**Figura R2:** Northern blot de disco imaginales y cerebros de larvas *wt*. Bandas reveladas con dos ribosondas de *ds* derivadas de secuencias procedentes de la región extracelular (EC) y la región citoplasmática y transmembrana (TM-CT). Las bandas reveladas sólo por una de las ribosondas contienen o exones extracelulares o parte del exón 12 (asteriscos rojos).

secuencia completa de la región citoplasmática y transmembrana (2,3Kb). Estos resultados sugirieron que en la etapa larvaria podrían expresarse diferentes isoformas de Ds; algunas de ellas contienen sólo la región extracelular o la región citoplasmática.

### 2.2 Análisis transcripcional de *ds* mediante RT-qPCR



**Figura R3:** Cuantificación mediante RT-qPCR de los exones en individuos control y en mutantes de *ds*. **A)** Esquema indicando la secuencia correspondiente a los fragmentos 12A y 12B. **B)** Representación gráfica con la cuantificación absoluta de los exones en tejido wt. **C)** Cuantificación relativa de los diferentes exones a partir de tejidos procedente de dos alelos mutantes fuertes. Representación grafica utilizando la media con SEM (error estándar de la media). Diferencia estadísticamente significativa \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.04$ ), \*\*\* ( $p < 0.03$ ).

Como los resultados de la técnica de northern blot sugieren la existencia de posibles isoformas, además del ADNc de 12 kb (Clark y cols., 1995), decidimos hacer el análisis de exones individuales mediante RT-qPCR. Teniendo en cuenta la presencia de diferentes bandas de ARN detectadas únicamente con la sonda TM-CT, diseñamos más de una pareja de cebadores para el exón 12 (4,2 Kb). De esta forma, el exón 12 queda dividido en dos fragmentos, el 12A correspondiente a la secuencia del fragmento de la región extracelular y transmembrana y el 12B con la región citoplasmática completa (Fig 3).

Un primer resultado es que los niveles de expresión de Ds son muy bajos ( $10^{-5}$  a  $10^{-3}$  ng/ $\mu$ l frente a 2microg de ARN total cargado). Además, la expresión de los exones es significativamente diferente. Como se puede observar en la Figura R3, la expresión del fragmento 12B, (región citoplasmática), es 2 veces la del fragmento 12A y mucho mayor que la expresión del resto de los exones correspondientes a la región extracelular, llegando a ser hasta 4 veces mayor que los exones 3 y 8.

De estos resultados se pueden extraer varias conclusiones; la primera es la confirmación de la expresión de diferentes isoformas de *ds* durante el desarrollo larvario; la segunda que, el

ADNc descrito en embriones y que contiene del exón 1 al exón 12 se expresa a unos niveles muy bajos (ver exón 2). Por último, este análisis ha permitido detectar la existencia de un exón no descrito previamente: el fragmento 12B (a partir de ahora exón 12B). Aunque no podemos confirmar su inicio y su final, sabemos que contiene la secuencia de la región citoplasmática y que no presenta región extracelular.

### 2.3 Análisis transcripcional por RT-qPCR de diferentes alelos *dachsous*

Tras la cuantificación de los exones a partir de ARN de tejidos *wt* (RT-qPCR absoluta), se llevó a cabo en paralelo la cuantificación en dos fondos de *ds* mutantes (RT-qPCR relativa) (Figura R3C)

En *ds<sup>38K</sup>*, la expresión de los exones no varía por igual respecto a los correspondientes exones en *wt* (Figura R3). Mientras algunos exones parecen expresarse a niveles semejantes a sus homólogos *wt* (ej: exón 7), en otros se observa un descenso considerable. Por el contrario, resulta llamativo el aumento observado en ciertos exones como el exón 2, en el cual se encuentra la metionina iniciadora.

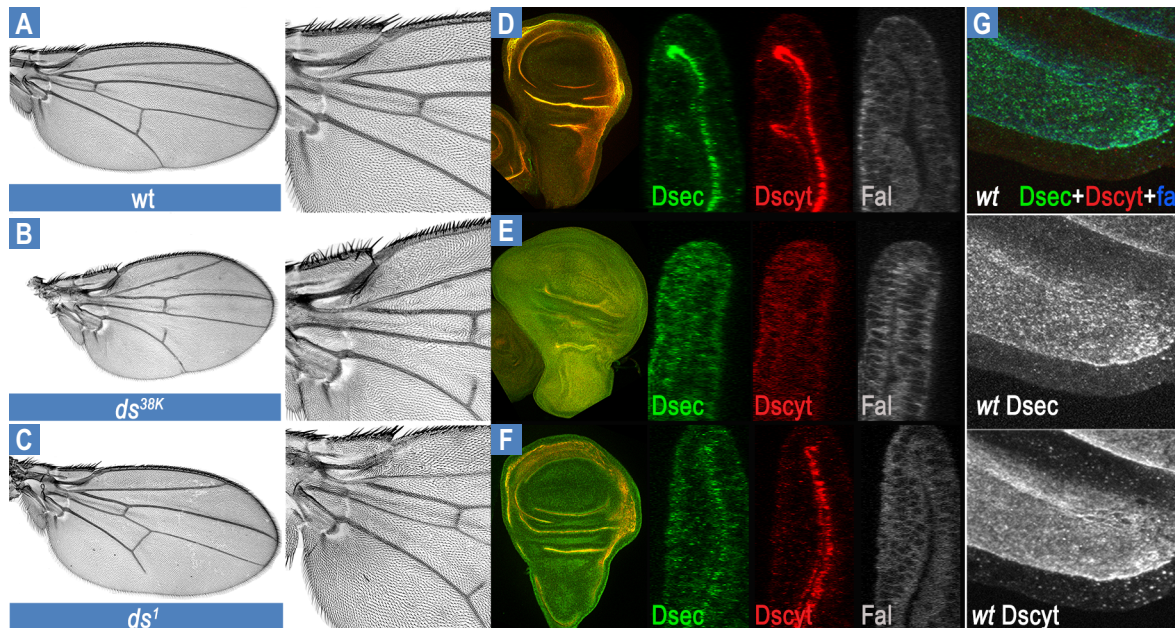
En el caso del alelo *ds<sup>36D</sup>*, la expresión de la mayoría de los exones disminuye drásticamente (aproximadamente el 90% ) con respecto a la muestra *wt* lo que concuerda con su clasificación de falta de función mas grave. Sin embargo, nuevamente el descenso del exón 2 es menor que el del resto, pues es tan sólo es el 50%.

Estos datos confirman la hipótesis sugerida por el resultado del northern blot. Las variaciones de expresión observadas en distintos exones, utilizando diferentes fondos mutantes (*ds<sup>36D</sup>*, *ds<sup>38K</sup>* y *wt*), indican que durante el desarrollo larvario se expresan diferentes isoformas de Ds. Por otro lado, estos resultados concuerdan con la clasificación de *ds<sup>36D</sup>* y *ds<sup>38K</sup>* como alelos reguladores. Estos, estarían afectando de forma distinta a la expresión de cada una de las isoformas. De esta manera, es muy posible que la lesión molecular asociada al alelo *ds<sup>38K</sup>* elimine elementos reguladores negativos que actúan sobre la expresión de ciertas isoformas.

### 2.4 Distribución espacial y localización subcelular de la proteína *Dachsous*

Para comprobar si las diferentes isoformas se traducen en proteínas, analizamos la expresión espacial de Ds en discos de ala *wt* y mutantes utilizando dos anticuerpos distintos, uno dirigido contra la región citoplasmática (Dscyt) y otro contra la región extracelular (Dsex). (Figura R4)

En discos de ala *wt*, observamos que ambos anticuerpos se localizan mayoritariamente en la región apical de la membrana. Estos resultados son congruentes con la función de Ds en el mecanismo de PPC. Sin embargo, al hacer un corte ortogonal en el disco imaginal, vemos que el anticuerpo Dscyt revela la existencia de una expresión punteada en el interior de la célula. Este patrón punteado, no se



**Figura R4:** Localización subcelular de la proteína Ds utilizando anticuerpos diferentes. Alas completa y magnificación de la región proximal de (A, A') *wt*, (B, B') *ds<sup>38K</sup>* y (C, C') *ds<sup>1</sup>*. Discos Imaginales de ala y sección Z mostrando la localización apical de la proteína Ds utilizando los anticuerpos Dscyt (rojo) y Dsec (verde) en (D) *wt*, (E) *ds<sup>38K</sup>* y (F) *ds<sup>1</sup>*. La tinción con faloidina (Fal) marca el contorno celular en el epitelio imaginal. (G) Imagen a mayor aumento de un corte Z del epitelio imaginal control (*wt*) muestra una expresión punteada en el interior celular solo detectada por el anticuerpo Dscyt.

observa en la tinción con el anticuerpo Dsex (Figura R4) lo que sugiere, que la proteína Ds también se encuentra en el citoplasma.

Posteriormente, hicimos un análisis de expresión similar en discos imaginales mutantes *ds<sup>38K</sup>* y *ds<sup>1</sup>*, alelos anotados como fuerte y débil respectivamente.

En discos *ds<sup>38K</sup>*, los niveles y la localización de Ds detectados con ambos anticuerpos son distintos. Con el anticuerpo Dsex, Ds presenta una distribución deslocalizada, aunque la cantidad de proteína parece similar a la detectada en discos *wt*. Por el contrario, con el anticuerpo Dscyt, la expresión de Ds es casi indetectable y la que se detecta no se encuentra localizada en apical (Figura R4). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por RT-qPCR, ya que el anticuerpo Dsex, dirigido contra la secuencia proteica codificada por los exones 2 y 3, presenta niveles más altos de expresión que el anticuerpo Dscyt dirigido contra la secuencia codificada por el exón 12B.

Al contrario que en el alelo fuerte, en *ds<sup>1</sup>* la expresión mayoritaria de Ds detectada con ambos anticuerpos se mantiene en apical. Sin embargo, también, existen niveles de proteína distribuida de forma difusa que sólo es detectada con el anticuerpo Dsex.

Estos resultados muestran una correlación directa entre la severidad del fenotipo y la deslocalización de la proteína fuera de la zona apical. Además, la distribución de la proteína detectada

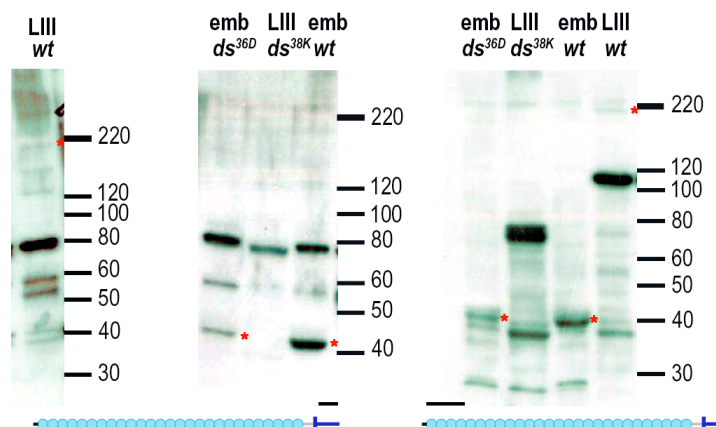


con el anticuerpo Dsex y Dscyt en diferentes fondos mutantes, sugiere que ambos podrían estar detectando la expresión de diferentes isoformas de Ds durante el desarrollo imaginal.

## 2.5 Detección de las proteínas Dachsous

Con el fin de poder identificar la expresión de las isoformas de Ds, realizamos un western blot en los tejidos utilizados para el análisis por RT-qPCR. Esto se llevó a cabo utilizando los anticuerpos Dscyt y Dsec (Figura R5).

En primer lugar, en extractos silvestres se detectan varias bandas diferentes según el anticuerpo utilizado; algunas de ellas se detectaron con ambos anticuerpos y otras únicamente por uno de ellos (Figura R5). Sorprendentemente, las bandas de extractos procedentes de embriones (*emb* y *ds<sup>36D</sup>*) y de larvas (*LIII* y *ds<sup>38K</sup>*) difieren en el peso molecular. Por ejemplo, la proteína de aproximadamente 120 KDa se expresa en larvas pero no en embriones y además sólo se detecta con Dsex. Por el contrario, en embriones se detecta una banda de aproximadamente 45 KDa con ambos anticuerpos. Además, con el anticuerpo Dscyt se detectan bandas de pequeño tamaño tanto en embriones como en larvas (entre 80 KDa y 40 KDa).



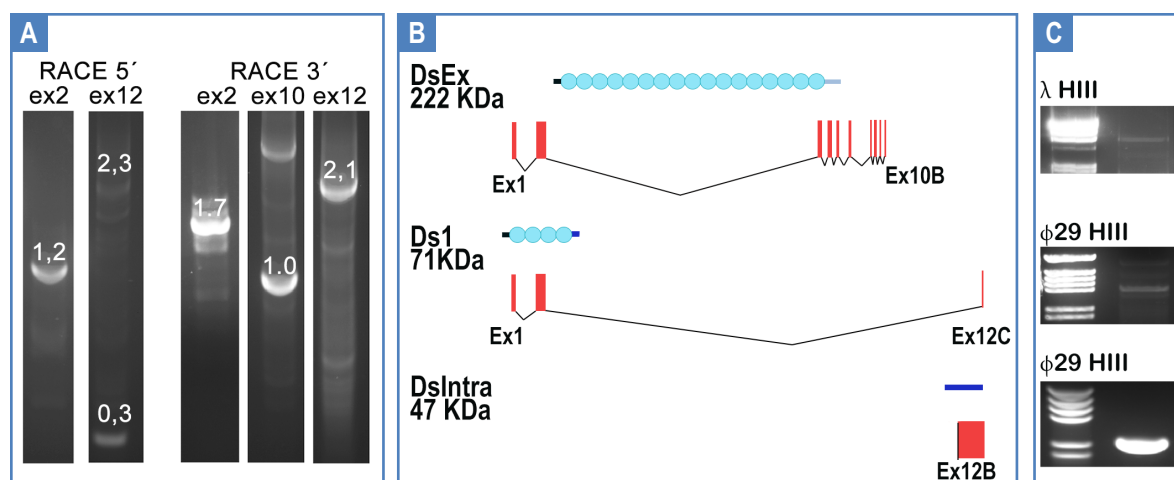
**Figura R5:** Western blot de extractos de discos imaginales y embriones utilizando los anticuerpos Dscyt y Dsec. El patrón de bandas depende del tejido de origen larvario (*LIII*) o embrionario (*emb*) y del anticuerpo utilizado. El análisis muestra la presencia de isoformas proteicas de Ds. En cada carril la cantidad de proteína total es de 30 µgr.

En concordancia con las bandas de ARN observadas en el estudio de northern blot, existen formas proteicas de Ds que sólo contienen región extracelular o región citoplasmática. Estos resultados, confirman la expresión de diferentes isoformas de Ds durante el desarrollo larvario. Las que se detectan son de menor tamaño que la proteína Ds expresada en embriones (385 KDa). Por otra parte, se puede observar que en el tejido larvario *ds<sup>38K</sup>* el patrón de bandas presenta una variación importante con respecto al tejido *wt*. Este dato iría en concordancia con la variación de los exones visto en la RT-qPCR y el resultado en los discos imaginales, ya que observamos una desregulación de las formas proteicas.

### 2.6 Estructura molecular de las isoformas transcripcionales de *dachsous*

Una vez establecida la existencia de isoformas decidimos utilizar la técnica RACE (Rapid amplification of cDNA ends) para analizar su estructura.

Para poder conocer la composición de exones de los ADNc de *ds* expresados en el desarrollo larvario se han diseñado cebadores para RACE para casi todos los exones. Los fragmentos amplificados se han clonado en un vector y se han analizado por secuenciación. Debido a las limitaciones de la técnica y al tamaño de los nuevos ADNc, sólo pudimos determinar con precisión la estructura de tres isoformas (Figura R6).



La primera de ellas, denominada DsEx, tiene un tamaño de 6,8 kb, comprende del exón 1 al 10 y codifica una proteína con 17 dominios de caderina de la región extracelular de Ds (Figura R6). La reacción de 3' RACE utilizando el oligonucleótido ubicado en el exón 10 da una banda específica de 1Kb. La secuencia resultante es similar a la descrita para el exón 10, pero con un nucleótido diferente en el extremo 3'. Este, produce un codón de terminación (TAA) seguido de parte de la secuencia del intrón adyacente. Esta variante del exón 10 original la denominamos exón 10B. Por lo tanto, DsEx es una isoforma de Ds soluble que contiene sólo parte de la región extracelular.

Otra isoforma, denominada Ds1, de 3,3Kb se caracterizó a partir del exón 2. Las secuencias de las bandas amplificadas con el oligonucleótido 5'RACE ex2 contienen un exón 2 incompleto y en fase, la región 3'UTR del exón 12. Estos resultados revelan la existencia de dos exones no descritos previamente que denominamos exón 2B (finaliza en el nt 2432 de L08811.2) y exón 12C (nt 11235-11339 de L08811.2). Dada la limitación de la técnica RACE para amplificar fragmentos de ADN largos,

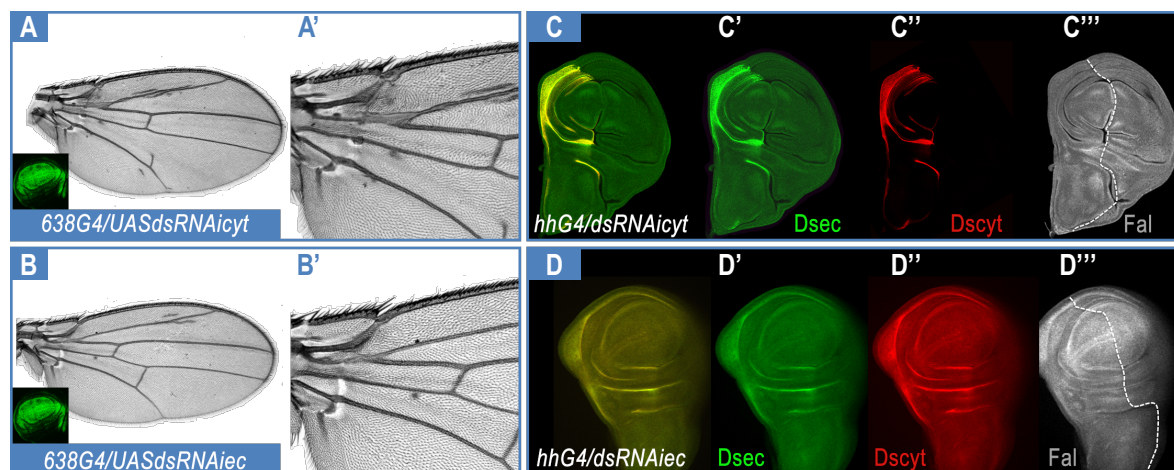
no pudimos encontrar una secuencia completa que contuviera del exón 1 al extremo 3' UTR del exón 12. Sin embargo, la banda amplificada por PCR utilizando una pareja de cebadores situados en los extremos 5' del exón 1 y 3' del exón 12 correspondía al tamaño esperado (Figura R6C)

Por último, identificamos la isoforma denominada DsIntra, de 4,9 Kb (incluyendo la región 3'UTR). Se utilizaron dos cebadores situados en las mismas bases del exon12 para las reacciones 5'RACE ex12 y 3'RACE ex12. Con 5'RACE ex12 se amplificaron dos bandas específicas de 0,3 Kb y 2,3 kb. Se descartó el ADNc correspondiente a la banda de 2,3Kb porque la secuenciación de varios clones derivados de esta reacción daban terminaciones del extremo 5' diferentes. Además, dado que el tamaño de la banda estaba en el límite de la amplificación fiable, se consideró que podía ser un extremo 5' artefactual. Sin embargo, el análisis de diferentes clones de la secuencia correspondiente a la banda de 0,3Kb, daba siempre la misma terminación 5' situada dentro del exón 12 original (Figura R6). En la secuencia que denominamos exón 12B (nt 10154 en la secuencia L08811.2) el extremo 5' está situado inmediatamente después del dominio de transmembrana. Finalmente, la reacción 3'RACE del exón 12 dio una banda de 2,1Kb que corresponde al extremo 3' del exón12 (Figura R6). La secuencia completa contiene una fase de lectura abierta que comprende toda la región citoplasmática. Por lo tanto, DsIntra codifica una proteína citoplasmática con la región citoplasmática de Ds y sin dominio transmembrana. Este resultado se confirmó repitiendo la reacción 5' RACE con otros cebadores ubicados en la secuencia correspondiente a la región citoplasmática del exón12.

Las isoformas descritas se confirmaron realizando una RT-qPCR con cebadores situados en los extremos 5' y 3' del primer y el último exón, que dieron como resultado fragmentos únicos con el tamaño de los ADNc propuestos (Figura R6). Comparando estos resultados con los datos de la técnica northern blot observamos correspondencia de tamaños entre la banda de 6Kb (ribosonda EC) y el ADNc de la isoforma DsEx; igualmente la banda de aproximadamente 3Kb detectada con ambas sondas (ribosondas EC y TM-CT) podría ser el ADNc de Ds1. Al hacer esta comparación con los resultados obtenidos mediante western blot, podemos ver cómo en tejido silvestre de larva III (usando el anticuerpo citoplasmático) se aprecia una banda aproximadamente 50 KDa que correspondería a la isoforma DsIntra. Por otra parte, usando el anticuerpo extracelular encontramos una banda a la altura de los 220 KDa que correspondería a DsEx, en ambos tejidos larvarios y quizá de forma más tenue en los tejidos embrionarios. Con respecto a Ds1, aunque no se ve ninguna banda del tamaño esperado en el tejido *wt*, en el tejido de *ds<sup>38K</sup>* vemos una sobreexpresión por debajo de 80 KDa, que aunque estaría algo más arriba de lo esperado (70-75 KDa) podría corresponder a esta isoforma. Esto a su vez sería consecuente con el resultado de la RT-qPCR, en el que apreciábamos altos niveles de exón 2 en el tejido de *ds<sup>38K</sup>*.

### 2.7 Análisis fenotípico de la sobreexpresión de diferentes ARNs interferentes

Los fenotipos *ds* más fuertes son causados por los alelos reguladores (*ds*<sup>38k</sup>, *ds*<sup>36D</sup>, *ds*<sup>05142</sup>). Sin embargo, los fenotipos débiles son causados por mutaciones que mapean en exones que codifican en la región extracelular (*ds*<sup>1</sup>, 30AGal4). Para poder establecer una relación entre los fenotipos y las diferentes isoformas decidimos analizar los fenotipos causados por la sobreexpresión de dos ARN interferentes (ARNi) utilizando el sistema UAS/Gal4. Los ARNi, que aparean de forma específica con secuencias de la región citoplasmática (exón 12B) y la región extracelular (exón 6), se denominan dsRNAicyt y dsRNAiexc respectivamente. Los fenotipos de ala observados cuando los ARNi se expresan de forma generalizada utilizando la línea 638-Gal4 son muy diferentes (Figura R7). La sobreexpresión de dsRNAiexc produce fenotipos similares al alelo débil *ds*<sup>1</sup> mientras que la



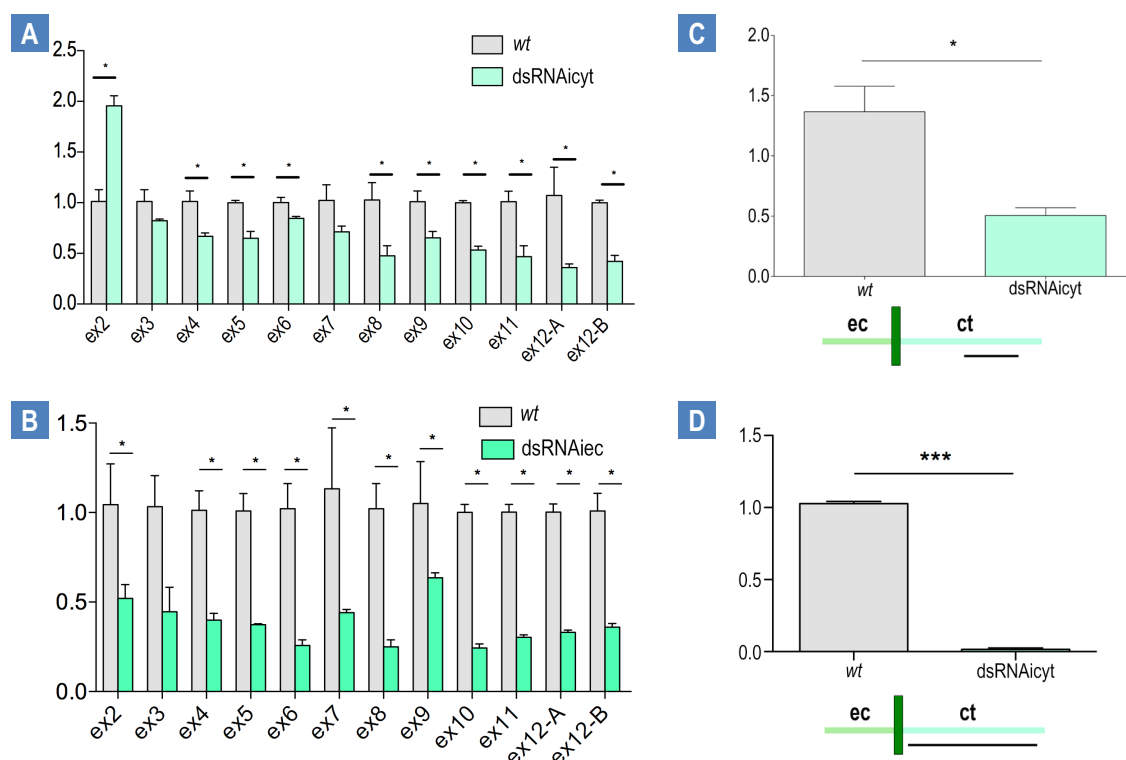
**Figura R7:** La sobreexpresión de dos ARNi diferentes reproducen los fenotipos de los alelos *ds* fuertes y débiles respectivamente. Alas y magnificación de la región proximal de alas (A, A') 638G4/UASdsRNAicyt y (B, B') 638G4/UASdsRNAiexc. Discos imaginales (C) hhG4/UASdsRNAicyt y (D) hhG4/UASdsRNAiexc teñidos con los anticuerpos (C', D') Dsec, (C'', D'') Dscyt. El compartimento P del disco que expresa dsRNAicyt está sobrecrecido y elimina completamente las proteínas Ds reconocidas por ambos anticuerpos. Por el contrario el compartimento P que expresa dsRNAiexc tiene un tamaño similar al control y la bajada de la expresión de Ds es muy baja. (D', D'') Tinción con Faloidina.

sobreexpresión de dsRNAicyt produce un fenotipo similar a los descritos en alelos fuertes. Estos resultados sugieren que las isoformas que contienen la región citoplasmática son importantes en las funciones de Ds en la PPC, la proliferación y el patrón de venas. También se analizaron los niveles de proteína Ds utilizando los anticuerpos Dsex y Dscyt en discos imaginales donde los ARNi se sobreexpresan en el compartimento posterior utilizando hh-Gal4 (Figura R7). Los niveles de proteínas en células que expresan dsRNAicyt son casi indetectables con ambos anticuerpos, lo que indica que las proteínas mayoritarias deben de contener parte de la región citoplasmática y de la extracelular. Por el contrario, la sobreexpresión de dsRNAiexc provoca una ligera disminución en los niveles de proteína

detectada con ambos anticuerpos. Este resultado está de acuerdo con el fenotipo débil observado en alas que sobreexpresan dsRNAiexc. Una explicación sería que la capacidad de interferencia de dsRNAiexc es menor que la de dsRNAicyt, o alternatively las isoformas que contienen la secuencia que aparea con dsRNAiexc (exón 6) es minoritaria y las isoformas con región extracelular que siguen expresándose son funcionalmente más importantes.

## 2.8 Cuantificación de la expresión de *dachsous* en condiciones de interferencia

Una explicación de la diferencia observada en los fenotipos causados por la sobreexpresión de los dos ARNi en el ala es que la eficiencia de interferencia de dsRNAicyt es mucho mayor que la de dsRNAiexc. Para comprobar este punto se decidió analizar la expresión de los exones mediante RT-qPCR y compararla con la expresión observada en células silvestres.



**Figura R8:** Cuantificación mediante RT-qPCR de los exones en tejidos que expresan dsRNAicyt y dsRNAiexc. Graficas que muestran la cuantificación relativa de exones con respecto al control (wt) en células imaginales expresando **A)** *tubG4/UASdsRNAicyt* y **B)** *tubG4/UASdsRNAiexc*. La reducción en los niveles de expresión del exon12B es todavía mayor utilizando cebadores situados en los extremos 5' y 3' de la región citoplasmática (**C**, **D**). Representación grafica utilizando la media con SEM (error estándar de la media). Diferencia estadísticamente significativa \*( $p < 0.05$ ), \*\*( $p < 0.04$ ), \*\*\*( $p < 0.03$ ).

Utilizando el sistema UAS/Gal4, partimos de ARN total de discos imaginales y cerebros que expresan de forma generalizada dsRNA<sub>icyt</sub> y dsRNA<sub>iexc</sub> utilizando la línea *tubG4* (Figura R8).

En células *tubG4/UASdsRNA<sub>icyt</sub>* observamos una disminución del 50% de la expresión en el exón 12B que contiene la secuencia que aparea con el ARNi (región citoplasmática). Este resultado no concuerda con la ausencia casi completa de proteína detectada con Dscyt en células dsRNA<sub>icyt</sub> (Figura R7). Una explicación a esta discrepancia es la presencia de otros ADNc que contienen parte de la región citoplasmática que se siguen expresándose en células dsRNA<sub>icyt</sub>. Es importante recordar que en la técnica de northern blot con la ribosonda TM-CT se detectaban varias bandas de menor tamaño a la región citoplasmática completa (Figura R2).

Para comprobar que efectivamente dsRNA<sub>icyt</sub> sólo está interfiriendo sólo algunas de estas isoformas, diseñamos otra pareja de cebadores que amplificasen el exón 12B completo. En este caso la interferencia es casi completa, siendo la disminución del 98,5%. En estas condiciones es sorprendente observar la pequeña disminución en el nivel de expresión de los otros exones respecto al wt. Resulta especialmente llamativo el aumento del exón 2, de forma similar al observado en *ds<sup>38K</sup>*.

En células *tubG4/UASdsRNA<sub>iexc</sub>*, a pesar de los fenotipos observados, la disminución en los niveles de expresión los exones es más pronunciada y más homogénea que con dsRNA<sub>icyt</sub>. Además, la expresión del exón 12B es mayor que en células dsRNA<sub>icyt</sub>.

Estos resultados indican que la región citoplasmática es esencial para realizar las funciones de Ds, en contraste con el modelo actual, que sugiere una función más relevante de la región extracelular, y confirman una regulación cruzada entre las diferentes isoformas que se expresan durante la etapa larvaria.

### 2.9 Análisis fenotípico de la sobreexpresión de las isoformas descritas de Dachsaus

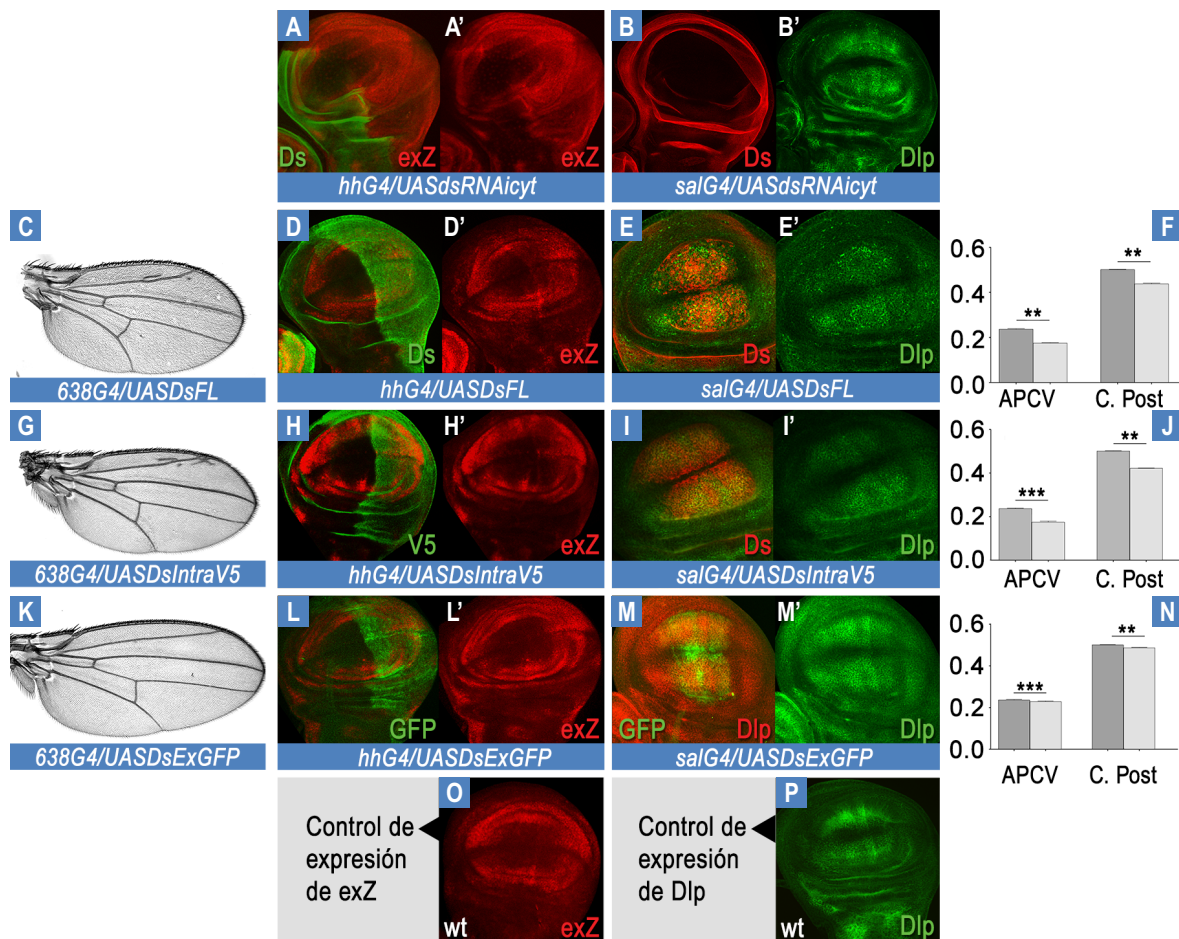
Datos publicados proponen que la proteína Ds participa de forma independiente en funciones diferenciadas en la PPC y modulando la vía de Hippo (Matakatsu y Blair, 2012). Para analizar la contribución de las diferentes isoformas a cada una de esas funciones se han analizado los fenotipos de las alas producidos por la sobreexpresión de las líneas transgénicas. Para ello se han utilizado unos parámetros medibles denominados  $R_1$  y  $R_2$ . El cálculo de los mismos se describe a continuación:

- Afectación de la PPC: Previamente se ha establecido que la distancia entre las venas ACV y PCV está relacionada con alteraciones en la PPC debidas a cambios en la orientación de la división celular, que modifican la forma del ala (Baena-López y cols., 2005; Pan y cols., 2013). Para analizar este parámetro ( $R_1$ ) se ha medido la distancia entre las venas ACV y PCV a lo largo de la vena L4 y se compara con la



longitud de la vena L3. Estas medidas se llevan a cabo utilizando la línea 638-Gal4 que se expresa de forma generalizada en el territorio presuntivo de ala durante el estadio larvario.

- Afectación de la vía de Hippo: Alteraciones en el ratio de proliferación celular causan variaciones en el tamaño del ala. El parámetro  $R_2$  mide el área del compartimento posterior con respecto al área total del ala. Estas medidas se llevan a cabo utilizando la línea hh-Gal4 que se expresa en todas las células del compartimento posterior del ala.



**Figura R9:** La sobreexpresión de DsIntra reproduce los fenotipos dominantes negativos de PPC y proliferación celular. La sobreexpresión de dsRNAicyt utilizando **A)** hhG4/exZ o **B)** salG4 produce un incremento de la expresión de exZ y Dlp respectivamente. La sobreexpresión de DsFL (**C,D,E**), DsIntraV5 (**G,H,I**) y DsExGFP (**K,L,M**). Graficas que muestran los parámetros  $R_1$  (APCV) y  $R_2$  (C. Post) de alas que utilizan las líneas 638G4 y hhG4 respectivamente para expresar las diferentes formas Ds. Expresión de exZ (hhg4/exZ) (**O**) y Dlp (**P**) en discos de ala control. Representación grafica utilizando la media con SEM (error estándar de la media). Diferencia estadísticamente significativa \* ( $p<0.05$ ), \*\* ( $p<0.04$ ), \*\*\* ( $p<0.03$ ).



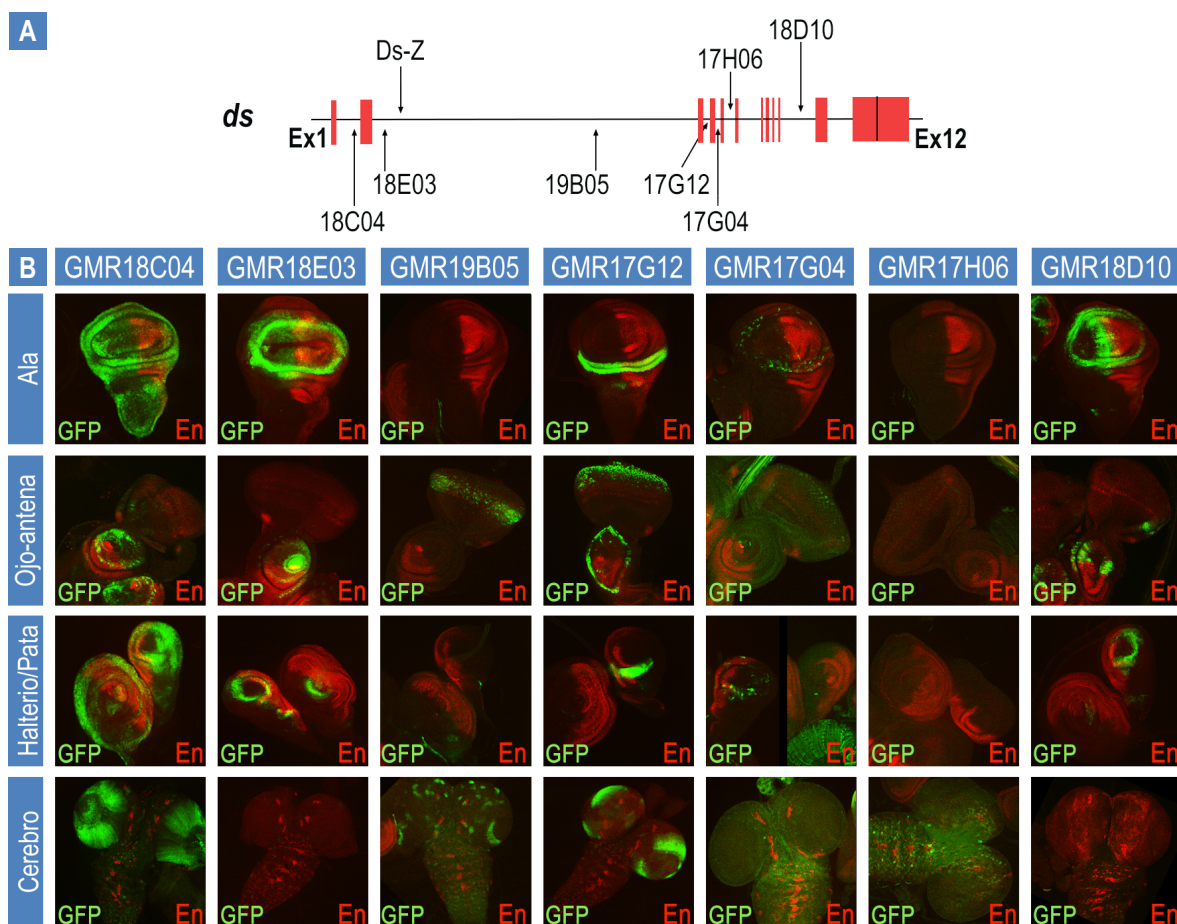
Las medidas se tomaron utilizando las dos líneas Gal4 indicadas; las alas ( $n \geq 6$ ) que sobreexpresan las isoformas DsExGFP y DsIntra se han comparado con el efecto que produce la sobreexpresión de la línea transgénica DsFL, utilizada en estudios genéticos publicados (Matakatsu y Blair, 2004; Casal y cols., 2006; Matakatsu y Blair, 2006; Matakatsu y Blair, 2012; Feng e Irvine, 2009; Bosveld y cols., 2012; Ambegaonkar y cols., 2012). Esta línea corresponde a la proteína Ds que se expresa en embriones. Se utilizó la estirpe *yw* como control. (Figura R9)

Con respecto a la PPC, la sobreexpresión de las diferentes formas de Ds producen un acercamiento entre las venas A-PCV de mayor a menor magnitud excepto la de la forma DsExGFP que no produce ningún cambio significativo (ref P. Lawrence). Este fenotipo dominante negativo es similar al observado en mutantes de falta de función. Sorprendentemente las isoformas que provocan un mayor efecto en la PPC (la reducción del parámetro  $R_1$  con respecto a un ala *wt* es de un 26%) son aquellas que contienen la región citoplasmática (DsIntra y DsFL).

Con respecto al tamaño del ala, todas las formas de Ds que se sobreexpresan provocan una reducción del área del compartimento posterior ( $R_2$ ) (Figura R9). La mayor reducción (16%) se observa con las formas que contienen la región citoplasmática completa (DsIntra y DsFL); sin embargo la reducción de DsExGFP aunque menor es significativa lo que indicaría que el dominio extracelular también interviene en la regulación de la vía de Hippo. Estos resultados muestran la importancia funcional de la región citoplasmática de Ds. Por otra parte, confirman datos previos que sugerían una posible función de Ds en la modulación la vía Hippo independiente de su función a través de Ft, mediante la interacción de ambas regiones extracelulares (Matakatsu y Blair, 2012; Baena-López y cols., 2008; Willecke y cols., 2008).

Por último, para confirmar que los fenotipos de proliferación observados depende de la vía de Hippo analizamos la expresión de los genes diana *d/p* y *ex* (Baena-López, 2008; Rodríguez, 2008). Un descenso en la actividad de Hippo provoca un aumento en la expresión de ambos genes monitorizado por los niveles de la expresión de lacZ del alelo *ex<sup>k12913</sup>* (*exZ*) y la proteína Dlp.

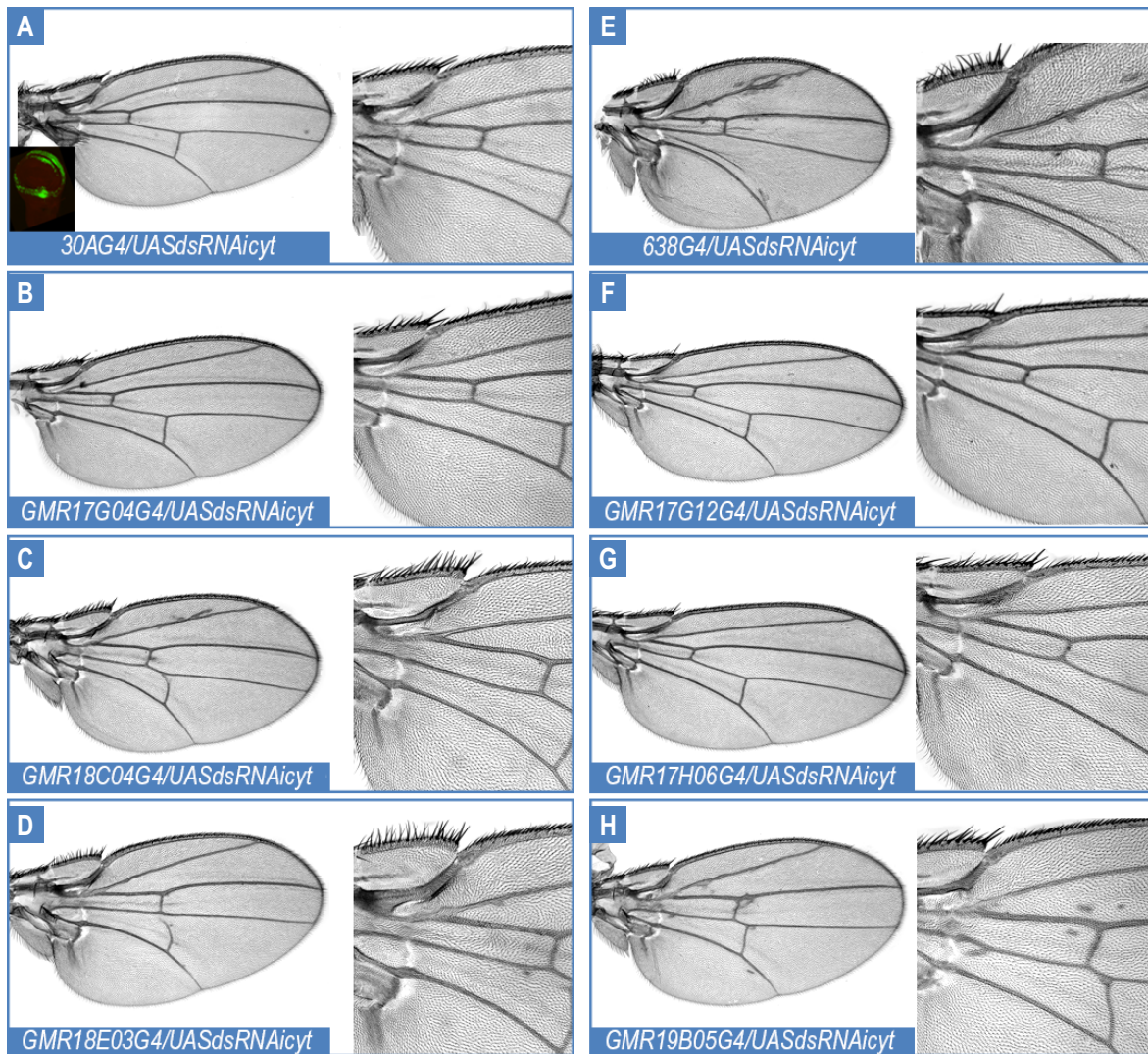
De acuerdo con estos datos, la sobreexpresión de DsIntra y DsFL producen el efecto esperado sobre *exZ* y Dlp. Utilizando hhG4 en discos imaginales se observa un aumento de los niveles de *exZ* y una expansión del dominio de expresión en el compartimento P, mientras que con *sa/G4* la expresión de Dlp desaparece casi completamente del dominio central de la región presuntiva del ala. Por el contrario, con DsExGFP los cambios en los niveles de expresión de *exZ* y Dlp son indetectables.



**Figura R10:** Patrón de expresión en discos imaginales y cerebro de líneas *Janelia* conteniendo secuencias del locus *ds*. **A)** Esquema indicando los puntos de inserción de las líneas Gal4 en las regiones intrónicas. **B)** Patrón de expresión correspondientes a las líneas indicadas en la parte superior (*G4/UAS GFP*) en los discos imaginales de ala, ojo-antena, halterio-pata y cerebro.

## 2.10 Regulación espacio-temporal de *Dachsous*

Como se ha mencionado anteriormente, los fenotipos más fuertes son causados por los alelos reguladores *ds*<sup>36D</sup> y *ds*<sup>05142</sup>. La lesión molecular de estos alelos se localiza en el intrón 2 (ver Figura R1); por otro lado, la expresión espacio-temporal de *ds* durante el desarrollo del disco de ala se puede visualizar por la expresión de lacZ del alelo *ds*<sup>05142</sup> (Rodríguez, 2004). Estos datos sugieren que en las regiones intrónicas del gen *ds* deben de existir elementos reguladores que controlan la expresión de las diferentes isoformas de Ds. Para investigar esta posibilidad analizamos la expresión de 7 líneas Gal4 de la colección *Janelia* utilizando el gen reportero *UAS-GFP* (Figura R10) (Pfeiffer y cols., 2008). Estos resultados revelan la existencia de elementos reguladores en cis en los intrones 1, 2, 3, 4, 5, y 10 que reproducen parcialmente la expresión del gen endógeno en diferentes discos imaginales y en el cerebro. En algunas líneas como GMR18C04 (intrón 1), GMR19B05 (intrón 2) y GMR18D10 (intrón 10) se observa una expresión ectópica, generalizada o localizada, en algunas regiones que sugiere



**Figura R11:** Requerimiento espacio-temporal de las isoformas de *Ds* conteniendo la región citoplasmática durante el desarrollo del ala. Fenotipos de las alas adultas y magnificación de la región proximal expresando *dsRNAicyt* con las siguientes líneas Gal4: **A)** 30A, **B)** GMR17G04, **C)** GMR18C04, **D)** GMR18E03, **E)** 638, **F)** GMR17G12, **G)** GMR17H06 y **H)** GMR19B05.

la presencia de elementos represores. Estos, estarían modulando la expresión espacio-temporal de *ds*. Por otro lado, algunas líneas sólo se expresan en discos imaginales o en cerebro, lo que indica la presencia de elementos reguladores específicos de tejido.

A continuación, analizamos los requerimientos espaciales de las isoformas utilizando la capacidad de estas líneas Gal4 de dirigir la expresión de un transgén UAS (Figura R11). Para ello analizamos las alas que sobreexpresan *dsRNAicyt*, que elimina las isoformas que contienen la región citoplasmática, y que con líneas como 638-Gal4 producen un fenotipo mutante fuerte.

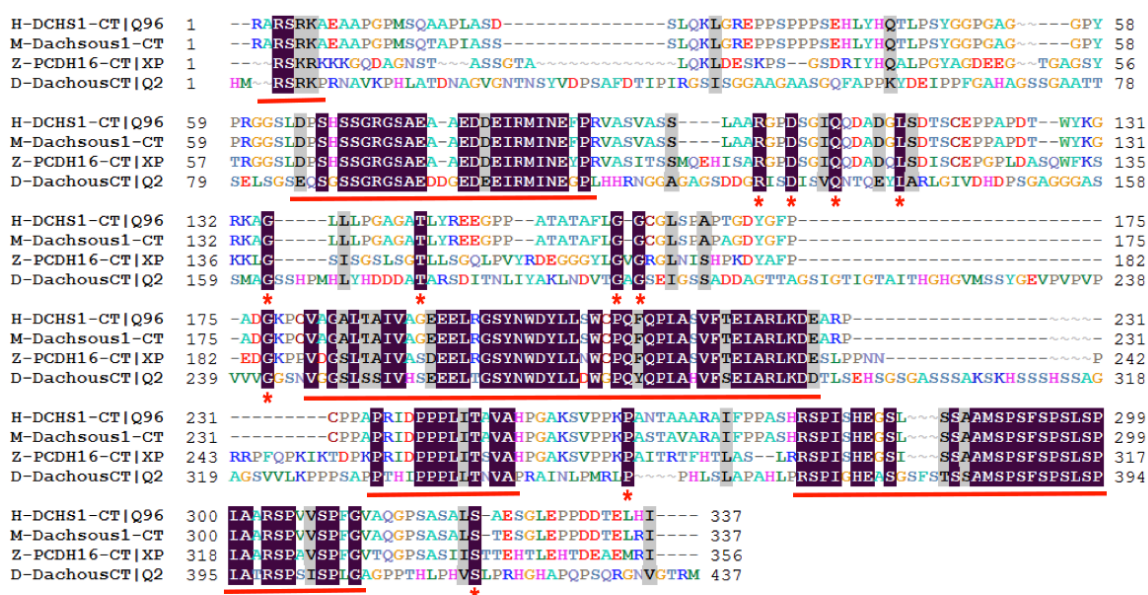
Las líneas GMR18C04 y GMR18E03 producen un fenotipo mutante fuerte coherente con su expresión en la zona presuntiva de axila (*hinge*) donde la expresión endógena de *ds* se produce a niveles altos. Sorprendentemente, las líneas GMR17G12 y 30AGal4, a pesar de que se expresan en



la región presuntiva de la axila, no producen ningún fenotipo mutante en el ala, lo que sugiere que las isoformas eliminadas por dsRNAicyt no son necesarias en esta región. La línea GMR17G04 produce un fenotipo débil, según el cual sólo se aprecia un ala ligeramente redondeada y un leve acercamiento de las venas ACV y PCV.

Curiosamente, GMR19B05 produce un fenotipo fuerte a pesar de que en discos de ala no se observa expresión. Este resultado indica que el fragmento de ADN genómico de GMR19B05 contiene elementos reguladores que dirigen la expresión de *ds* en otras fases del desarrollo imaginal diferentes a larva III.

Estos resultados muestran un grado adicional de complejidad en la regulación del gen en el que la expresión de las diferentes isoformas *Ds* está finamente regulada en el espacio y el tiempo en los diferentes tejidos utilizando una combinación de elementos reguladores situados en las regiones intrónicas.



**Figura R12:** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la región citoplasmática de la proteína *Ds* de *Drosophila* (D) y su homólogo *Dchs1* en ratón (M), pez cebra (Z) y humano (H) muestra dominios conservados (línea roja y asteriscos). En la parte inferior, esquema mostrando el nombre asignado a cada una de estas regiones para generar las líneas transgénicas *DsICΔ*.

### 3. Análisis funcional de los dominios conservados en la región citoplasmática de Dachsous

Los resultados moleculares y el análisis fenotípico de sobreexpresión, utilizando diferentes formas de Ds y de ARN interferentes, muestran que la región citoplasmática de Ds tiene una importancia funcional igual o mayor que la región extracelular. Se decidió realizar un análisis *in silico* de la región citoplasmática de Ds para buscar secuencias conservadas mediante un alineamiento múltiple. Para ello se emplearon dichas regiones citoplasmáticas de los homólogos de Ds en diferentes organismos (Figura 12 J. Sierra datos no publicados). Utilizando los programas T-Coffee y Clustal X se pudieron encontrar cinco regiones muy conservadas además de algunos residuos únicos (Pro, Asp, Glu, Leu, Gly, Thr).

Para entender la relevancia de cada uno de estos dominios en las diferentes funciones que lleva a cabo Ds durante el desarrollo imaginal, decidimos generar líneas transgénicas independientes de la región citoplasmática eliminando cada uno de estos dominios. Las líneas obtenidas se denominaron DsICΔ1, DsICΔ2, DsICΔ3, DsICΔ4 y DsICΔ1Δ4 que pierde los dos dominios; no conseguimos líneas de DsICΔ5 después de diferentes intentos utilizando varias estrategias (Figura 12).

#### 3.1 Análisis fenotípico de la sobreexpresión de las formas DsICΔ

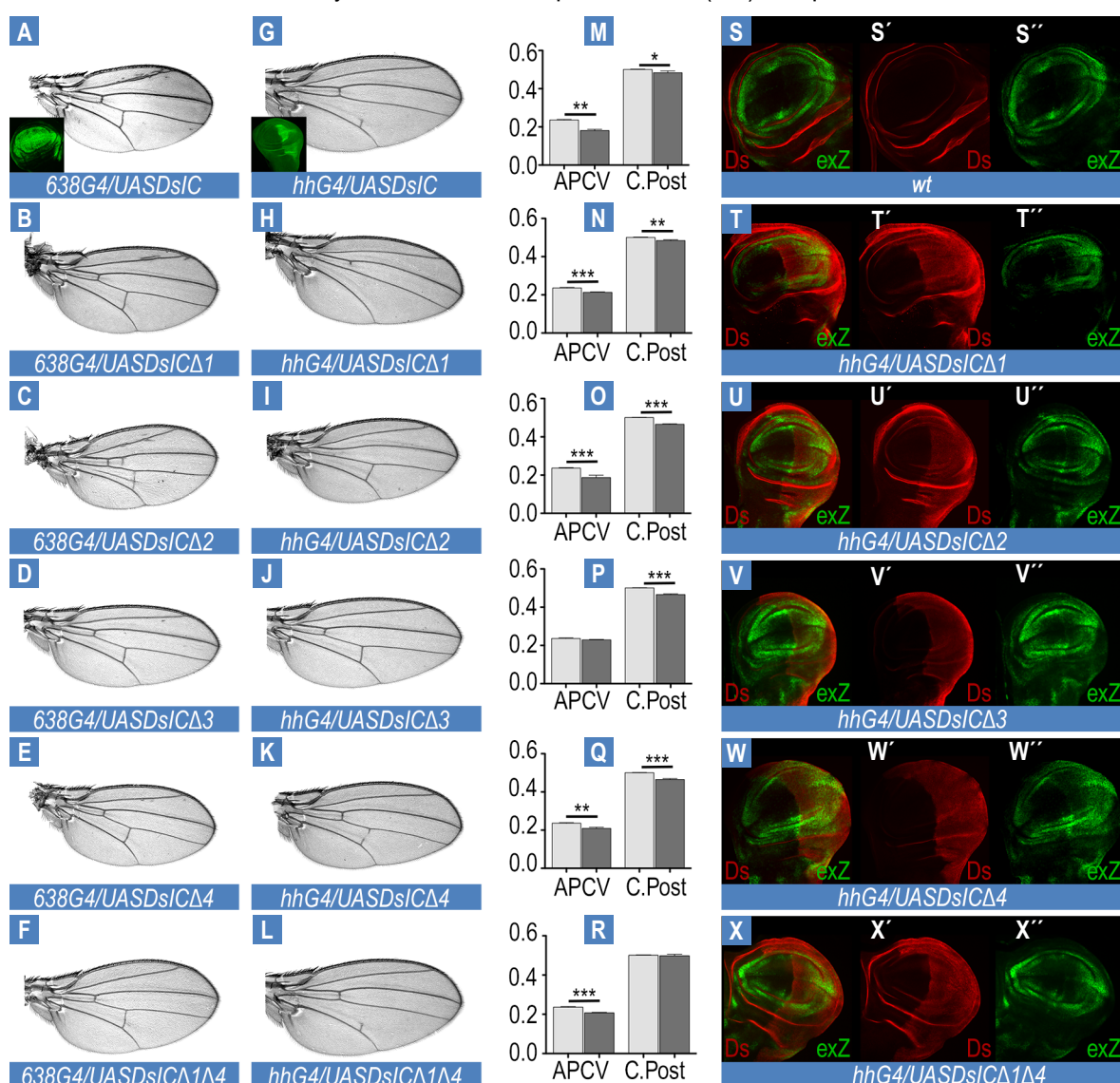
Los fenotipos mutantes *ds* no se pueden rescatar con la sobreexpresión de ninguna de las isoformas descritas. Esto probablemente se deba a que es necesaria la coexpresión de varias isoformas y a unos niveles determinados. Esto se deduce de los datos de RT-qPCR, en los que parece existir un regulación cruzada entre las mismas, lo que explicaría el efecto dominante negativo observado con la sobreexpresión. Basándonos en este dato, el fenotipo de cada una de las formas DsICΔ se analiza por su sobreexpresión en un fondo silvestre (*wt*) y se compara con las alas que sobreexpresan DsIC, que contiene la región citoplasmática completa. Para las mediciones de los parámetros  $R_1$  y  $R_2$  se comparan con alas silvestres y con alas que sobreexpresan la región citoplasmática completa (Figura 13). Las líneas Gal4 utilizadas son 638-Gal4 y hh-G4, las mismas que se utilizaron en el apartado 2.9.

En este apartado además se ha tenido en cuenta el fenotipo de extravenas alrededor de las venas L2 así como la ausencia de las venas ACV y PCV.

En el caso de DsIC, las alas tienen una forma más redondeadas y  $R_1$  tiene un valor arbitrario de 0.18, frente a 0.23 del *wt* (disminución del 21%). Sin embargo, en  $R_2$  la disminución es menor, pasando de 0.50 a 0.48 (3,5%). En ambos casos los resultados son estadísticamente significativos. Además, en las alas 638G4/DsIC se aprecia tejido de vena alrededor de L2 (extravenas).

Con la sobreexpresión de DsICΔ1 el acercamiento entre ACV y PCV es menor que con la sobreexpresión de DsIC (10%) mientras que el área del compartimento P es similar (siendo la disminución con respecto al *wt* 3,5% para ambos). Sin embargo las venas ACV y PCV desaparecen en el compartimento P. Por tanto, el dominio 1 parece necesario para la función de Ds en la PPC y la formación de venas.

En las alas que expresan DsICΔ2 la distancia entre venas es similar a DsIC (20%); sin embargo se observa una reducción mayor del área del compartimento P (7%) aunque la PCV no está afectada.



**Figura R13:** Correlación entre los diferentes dominios citoplasmáticos de Ds y las funciones de PPC y proliferación celular. Alas adultas que expresan las formas DsICΔ indicadas utilizando las líneas (A-F) 638G4 y (G-L) hhG4. (M-R) Cuantificación de los parámetros R<sub>1</sub> (APCV) y R<sub>2</sub> (C. Post) Representación grafica utilizando la media con SEM (error estándar de la media). Diferencia estadísticamente significativa \* (p<0.05), \*\* (p<0.04), \*\*\* (p<0.03). (S-X'') Discos imaginales de ala mostrando la expresión exZ para monitorizar la actividad de la vía de Hippo.

Por tanto el dominio 2 parece contribuir preferentemente a la función de Ds en el control de la proliferación celular. Además, se observa un fenotipo de ausencia total de la ACV.

La apariencia de las alas DsIC $\Delta$ 3 es similar a la de las alas control tanto en la forma más alargada como en la vena L2. También la distancia entre ACV y PCV es prácticamente igual a la que se observa en *wt*; sin embargo, con *hhG4* la reducción del compartimento P es mayor que con DsIC (7%). El dominio 3, que contiene una secuencia de aminoácidos semejante a un dominio truncado de unión a  $\beta$ -catenina, parece ser necesario para la PPC y la proliferación celular, aunque el efecto sobre cada una de ellas es opuesto (Clark y cols., 1995). Por tanto, aunque es incapaz de unir  $\beta$ -catenina debe interactuar con proteínas que participan en ambos procesos.

La sobreexpresión de DsIC $\Delta$ 4, igual que la de DsIC $\Delta$ 3, tiene un efecto opuesto sobre los parámetros  $R_1$  (disminución del 11,5%) y  $R_2$  (disminución del 7%) pero este es mas moderado en el acortamiento de la distancia entre venas. Además, la vena PCV no está completa en alas *hhG4* como ocurre con DsIC $\Delta$ 1. Estos resultados sugieren que el dominio 4 participa en la formación de venas, en la PPC y en el control de la proliferación.

Por último, la sobreexpresión de DsIC $\Delta$ 1 $\Delta$ 4, que elimina los dominios 1 y 4, no tiene un efecto sumatorio de los efectos de los fenotipos de DsIC $\Delta$ 1 y DsIC $\Delta$ 4 pero se observa una recuperación de los parámetros  $R_1$  (disminución del 12%) y  $R_2$  (disminución del 0,56%) hacia los valores silvestres lo que indica que este dominio participa en la función de Ds en PPC y en la vía de Hippo.

Como se hizo con la sobreexpresión de las isoformas Ds, analizamos en discos imaginales que expresaban las formas truncadas (*hhG4/DsIC $\Delta$* ) la expresión de *exZ* (Figura R13). Como se puede observar, en los discos imaginales que sobreexpresan DsIC $\Delta$ 2, DsIC $\Delta$ 3 y DsIC $\Delta$ 4 en el compartimento P, los niveles de *exZ* aumentan, y el dominio de expresión se expande. Por tanto, estos resultados muestran una correlación entre la reducción del compartimento P y los cambios en la actividad de la vía de Hippo. Hasta el momento no se conoce ningún gen que permita establecer una relación entre la actividad de la PPC y sus niveles de expresión.

En resumen, el estudio fenotípico y de expresión de las formas DsIC $\Delta$  sugiere la existencia de dominios en la región citoplasmática que participan de forma independiente en la PPC y en proliferación celular. En aquellos casos en los que la eliminación del dominio produce recuperación de la alteración, es decir, se rescata el efecto dominante negativo de DsIC, como en el caso de DsIC $\Delta$ 1 y DsIC $\Delta$ 1 $\Delta$ 4, se puede establecer una relación más directa entre la función y el dominio. Sin embargo, en los casos en que se produce un agravamiento del fenotipo, como en DsIC $\Delta$ 2, DsIC $\Delta$ 3 y DsIC $\Delta$ 4, es más difícil de interpretar. Para poder establecer una relación más concluyente entre los dominios conservados y las funciones de Ds será necesario planear experimentos complementarios.



### 3.2 Fosforilación de la región citoplasmática de Dachous

El análisis *in silico* de la región citoplasmática de Ds ha permitido identificar motivos de unión a proteínas con dominios PDZ, regiones ricas en residuos de prolina y residuos fosforilables por diferentes tipos de quinasas (Figura R14).

Se sabe que la fosforilación es un mecanismo importante de la PPC; la afinidad entre Ds y Ft está modulada por la actividad quinasa de Fj que fosforila residuos de serina en la región extracelular de ambas proteínas (Ishikawa y cols., 2008; Simon y cols., 2010; Brittle y cols., 2010), otras quinasas como Disc-overgrown (Dco) y Nemo (Nmo), participan en polaridad planar celular, aunque no se conoce muy bien su mecanismo de acción (Klein y cols., 2006; Strutt y cols., 2007; Fiehler y cols., 2007; Verheyen y cols., 2001). Para investigar si los residuos de la región citoplasmática de Ds se fosforilan, expresamos en cultivos de células S2 de *Drosophila* seis plásmidos de expresión que contenían las secuencias correspondientes a DsIC, DsICD1, DsICD2, DsICD3, DsICD4 y DsICD5 marcadas con GFP. En los experimentos se utilizaron dos fosfatasa diferentes; TSAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase o fosfatasa alcalina termosensible) y CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase o fosfatasa alcalina de intestino de ternera). Con ambas se obtuvieron los mismo resultados (Figura R15).

Una observación interesante es la presencia de dos bandas de aproximadamente 60 KDa que se corresponden con el tamaño de la región citoplasmática de Ds (Figura R15). Aunque la diferencia de tamaño que se observa es grande para ser una fosforilación, decidimos analizar la movilidad

**Figura R14:** Representación esquemática de la región citoplasmática de Ds mostrando la presencia de motivos PDZ, regiones ricas en prolina y residuos de serina potencialmente fosforilables identificados mediante un análisis *in silico* con los programas: InterProScan (EBI), Prosite (Expasy-SIB), MyHits (SIB) y Eukaryotic Linear Motif Resource (ELM)

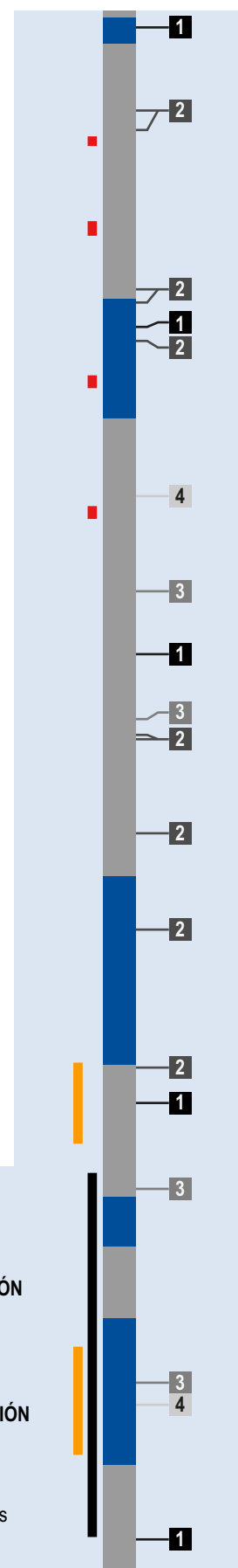
■ Dominios Δ

#### SITIOS DE FOSFORILACIÓN

1 pck      2 ck2  
3 gsk3      4 ck1

#### DOMINIOS DE INTERACCIÓN

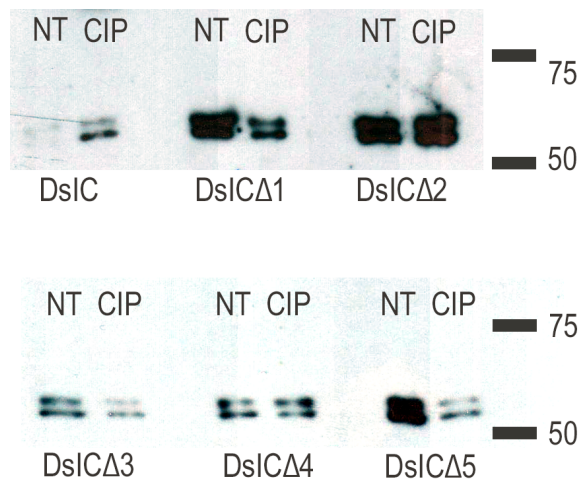
■ Dominios PDZ  
■ Región rica en Pro  
■ Región rica en serinas



electroforética de estas bandas tras un tratamiento con fosfatasas para estar seguros de que no se estaba produciendo dicha fosforilación. Empleamos dos fosfatasas distintas, pero con ambas obtuvimos el mismo resultado: el doblete se mantenía y la movilidad electroforética parecía no modificarse.

Estos resultados sugieren que en estas condiciones no parece tener lugar la fosforilación de residuos de la región citoplasmática. Por otra parte, debe existir otro tipo de procesamiento de la proteína Ds que da lugar a las dos bandas detectadas.

### 4. Estudio de interacciones genéticas de la proteína Dachshous con nuevos genes candidatos

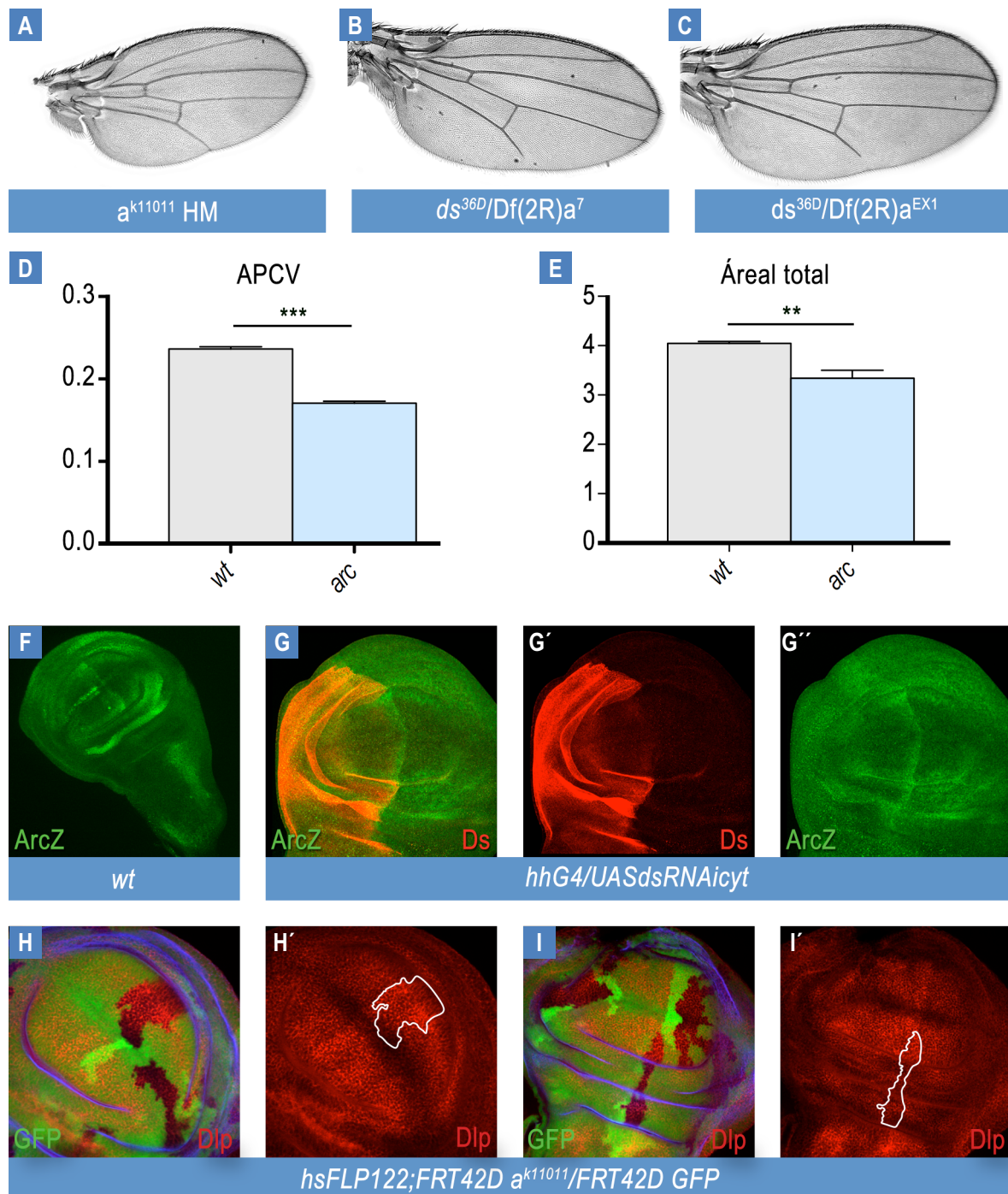


**Figura R15:** Análisis de fosforilación de la región citoplasmática de Ds. Western blot de lisados de células S2 que expresan las diferentes formas DsICΔ indicadas. Comparación de los lisados no tratados (NT) y tratados con la fosfatasa (CIP).

Como se ha mencionado previamente el análisis *in silico* de la región citoplasmática, además de los residuos potencialmente fosforilables, ha mostrado la presencia de varios motivos de unión de dominios PDZ (Figura R14). Este resultado lo utilizamos como aproximación para la búsqueda de genes candidatos a participar en la vía de Ds/Ft, tanto de la PPC como de la proliferación. Estudios genéticos muestran que las proteínas con dominios PDZ se localizan en la región apical de la membrana y actúan reclutando a otras proteínas con dominios PDZ para formar complejos proteicos funcionales. Ds y Ft se localizan en la región subapical de la membrana y los fenotipos analizados sugerían que Arc y

Dishevelled podrían actuar en la vía de Ds/Ft. Se ha estudiado con detalle la participación de Dsh en la vía de Fz/Fmi. Sin embargo datos obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que Dsh también interacciona con la vía Ds/Ft (Rodríguez, 2004). Por lo tanto decidimos analizar las interacciones de estos dos genes con Ds, así como con Nemo (Nmo) una serina/treonina quinasa que modula la actividad de varias vías de señalización durante el desarrollo de los discos imaginales.

#### 4.1 Interacción genética entre *dachsous* y el gen *arc*

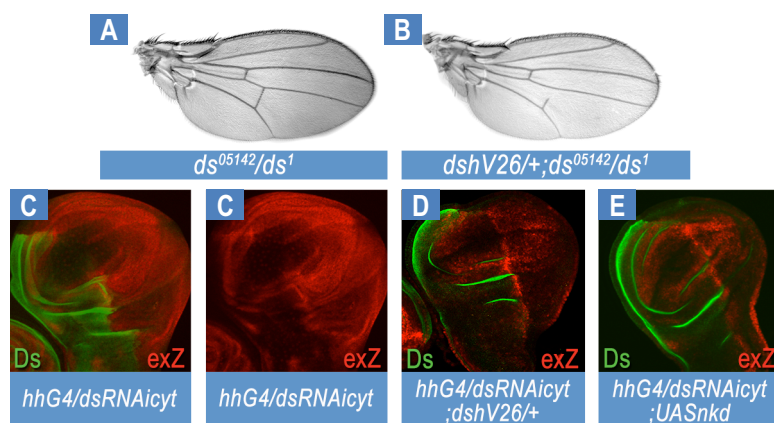


**Figura R16:** Interacción genética de *ds* y *arc*. Los alelos *arc* (**A**) exhiben defectos en las alas de PPC y crecimiento. (**B**, **C**) combinaciones heteroalélicas de *ds* y *arc* reproducen los fenotipos descritos en algunos alelos *ds*. **D** y **E**) Representación grafica de los ratios  $R_1$  y  $R_2$  del alelo  $a^{k11011}$  con respecto al *wt* utilizando la media con SEM (error estándar de la media). Diferencia estadísticamente significativa \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.04$ ), \*\*\* ( $p < 0.03$ ). (**F**, **G**) La expresión de *arcZ* (*lacZ*) en el disco está regula por Ds. (**H-I**) La falta de función de *arc* en clones situados en la región central produce un descenso en la actividad de Hippo visualizado con la expresión de Dlp.

El gen *arc* (*a*) codifica una proteína con 2 dominios PDZ, sin homología con otras proteínas PDZ conocidas, que se localiza en la región apical y se expresa en los discos imaginales (Liu, 2000). En el disco imaginal de ala y de ojo-antena los dominios de expresión de *arc* y *ds* colocalizan parcialmente. Por otra parte, el fenotipo de alelos *a* viables (*a*<sup>k11011</sup>; inserción PlacZ) reproducen el acercamiento de venas ACV-PCV asociado a defectos en la PPC y la reducción del tamaño del ala (Figura R16).

Por tanto, decidimos analizar los fenotipos de alas de combinaciones transheteroalélicas de *ds*<sup>36D</sup> y *Df(2R)a*<sup>EX1</sup> y *Df(2R)a*<sup>7</sup>, dos deficiencias internas generadas por la escisión imprecisa de *a*<sup>k11011</sup>. La eliminación de una copia de cada uno de los genes produce un fenotipo de ala que consiste en la eliminación de la parte distal del ala L5 y un acercamiento entre las venas ACV y PCV que recuerda al fenotipo *ds*<sup>1</sup>. Sin embargo, no se observa alteración en la orientación de los tricomas ni de las quetas. Este resultado indica que existe una interacción entre *arc* y la vía de Ds/Ft. A continuación analizamos la expresión de *a*<sup>k11011</sup> en discos de ala que sobreexpresan *hhG4/UAS-dsRNAicyt*. Los niveles de expresión de lacZ disminuyen en todo el compartimento P, lo que indica que Ds modula la transcripción de *arc*. Para saber si la falta de función de *arc* modifica la actividad de Hippo, como sugiere la reducción de tamaño de las alas *a*<sup>k11011</sup>, analizamos la expresión de Dlp en clones de recombinación mitótica *a*<sup>k11011</sup>; en la región central del ala se observa una ligera expansión del dominio de Dlp, no así en las regiones más laterales del territorio de ala. Estos resultados indican que *arc* es un nuevo componente de la vía de Ds/Ft que participa en las funciones de PPC y proliferación celular modulando la actividad de Hippo.

### 4.2 Interacción genética entre *dachsous* y *dishevelled*



**Figura R17:** Interacción genética de *ds* y *dsh*. (A y B) Los defectos producidos por la falta de función de *ds* (*ds*<sup>05142/ds</sup><sup>1</sup>) se agravan cuando se elimina una copia de *dsh*. En discos de ala (C) el sobrecrecimiento causado por la expresión de dsRNAicyt en el compartimento P se revierte con (D) la eliminación de una copia de *dsh* o (E) la sobreexpresión de Nkd.

Además de la función de Dsh a través de la vía de Fz/Fmi en la PPC (Simons y cols, 2009; Axelrod y cols, 2001) resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican una interacción genética de Ds y Dsh en procesos que tienen lugar en etapas previas del desarrollo imaginal (Rodríguez, 2004). La eliminación de una copia de *dsh* produce un agravamiento de los defectos observados en

mutantes *ds* que consisten en malformación de las uniones tarsales y reducción del tamaño de la pata (Rodríguez, 2004). Este efecto es contrario al observado en mutantes de la vía Fz/Fmi que produce uniones tarsales extras (Held y cols., 1986).

En el ala, la eliminación de una copia de *dsh* agrava el fenotipo de la combinación heteroalélica de *ds<sup>05142</sup>/ds<sup>1</sup>* (Figura 17); la combinación contraria, que elimina una copia *ds* (*ds<sup>36D</sup>*) en individuos viables homocigotos *dsh<sup>1</sup>* produce la muerte.

Para poder ver si Dsh participa en la función de Ds sobre la vía de Hippo, comparamos la expresión de exZ en discos imaginales *hhG4/UAS-dsRNAicyt* y RNAiCT *dsh<sup>V26/+</sup>;hhG4/UAS-dsRNAicyt*. La eliminación de una copia de *dsh* produce dos efectos claros: una reducción de la sobreexpresión de exZ producida por dsRNAicyt hasta niveles similares a los de las células silvestres (en comparación con células del compartimento A) y una reducción del sobrecrecimiento causado por la expresión de dsRNAicyt en el compartimento P (comparar con la Figura R7). Además en las células A adyacentes al borde del compartimento A/P aparece expresión ectópica de exZ, lo que sugiere que en los bordes del territorio se activa de forma no autónoma la vía de Hippo. Similares resultados se obtuvieron sobreexpresando Naked (Nkd) en discos *hhG4/UAS-dsRNAicyt;UAS-Nkd*. Nkd es una proteína con dominios EF-hand que interacciona directamente con el dominio PDZ de Dsh (Rousset y cols., 2001)

Estos resultados indican que, además de su función en la PPC, Dsh participa en la regulación de la proliferación celular a través de Ds modulando la actividad de la vía de Hippo.

### 4.3 Interacción genética entre *dachsous* y *nemo*

El gen *nmo* pertenece a la familia de las serina/treonina quinasas y participa en el desarrollo imaginal modulando la actividad de varias vías de señalización que regulan el desarrollo del ala y la correcta orientación de los ommatidios del ojo (Verheyen y cols., 2001; Mirkovic y cols., 2002; Fiehler y cols., 2008). Las alas *nmo<sup>P</sup>/nmo<sup>DB24</sup>* muestran alteraciones en el tamaño y la forma del ala y también en el patrón de las venas, alteraciones semejantes a las descritas para los alelos *ds* como acercamiento de ACP y PCV, ausencia de venas L5 (distal) y extravenas en L2 (comparar Figura R18 y Figura R1). La eliminación de una copia de *nmo* en alas que sobreexpresan de forma generalizada dsRNAicyt produce dos efectos aparentemente contrapuestos: por un lado se incrementa la forma redondeada del ala y el acercamiento de las venas ACV-PCV, mientras que el tamaño del ala parece recuperarse.

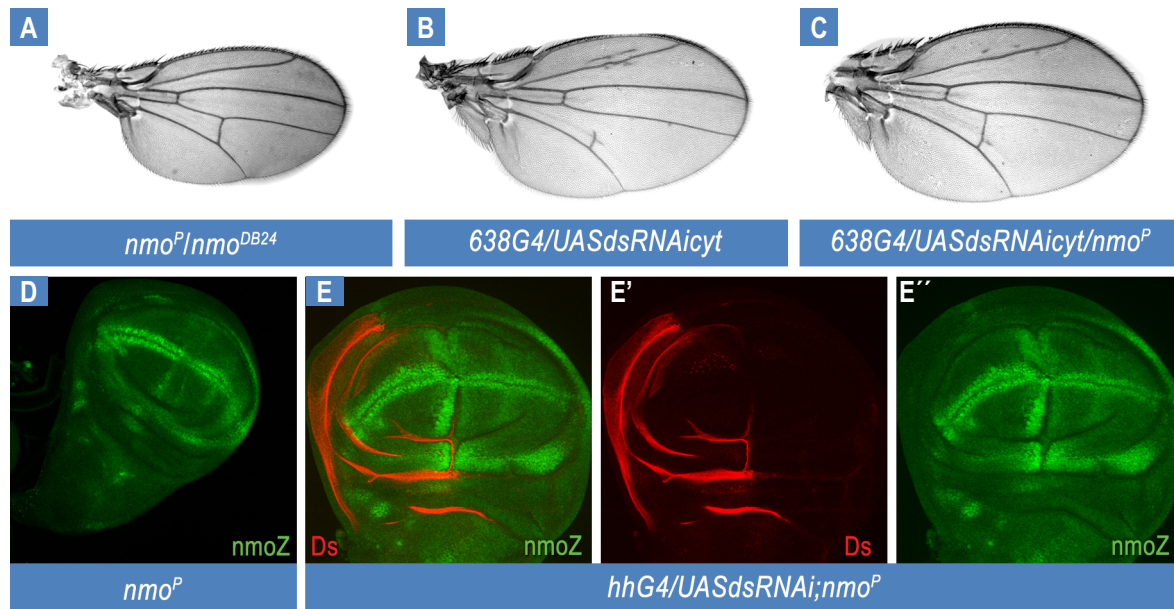
Por otra parte, el patrón de expresión de Ds y *nmo<sup>P</sup>* en la región presuntiva de ala y axila solapan parcialmente. A continuación, se analizó la expresión de *nmo<sup>P</sup>* en células *hhG4/UAS-dsRNAicyt*, los



## RESULTADOS

resultados muestran que la expresión de Nemo está incrementada en la región presuntiva de axila y en las células A adyacentes al borde del compartimento A/P de forma similar a como ocurre con *exZ*.

Estos resultados sugieren que Nemo participa en la vía de Ds/Ft que regula PPC y proliferación



celular. Nemo es regulado por Ds, lo que provoca un incremento de los niveles de Nemo en células *ds* mutantes (efecto autónomo) y una activación ectópica en las células silvestres adyacentes al borde del territorio mutante (efecto no autónomo). Este mismo efecto ocurriría con *exZ*, lo que sugiere que la quinasa Nemo podría estar modulando la actividad de la vía de Hippo.

## 5. Homólogos del gen *dachsous* en el ratón

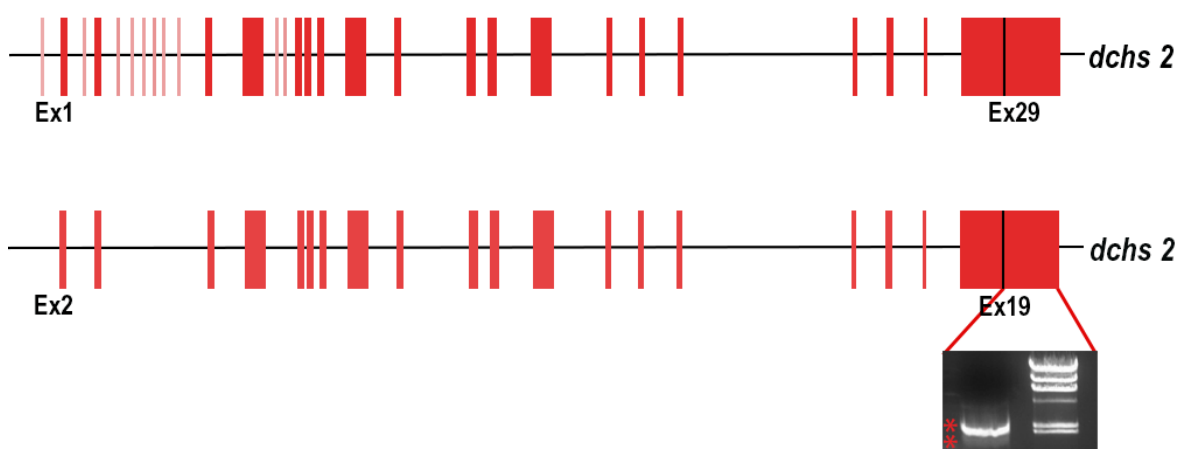
El mecanismo de señalización de la vía de Ds/Ft en la PPC y en la vía de Hippo está conservado evolutivamente, y la mayoría de los componentes identificados en *Drosophila* y sus interacciones reguladoras se encuentran en vertebrados (Simons, 2008). La PPC se observa durante la formación de multitud de órganos en vertebrados, pero es en el oído interno donde mejor se ha estudiado su función (Wang y cols., 2005). En vertebrados se conocen la secuencia de dos homólogos de *ds* que reciben el nombre de *dachsous1* (*dchs1*) y *dachsous2* (*dchs2*). La expresión de ambos genes es muy distinta: *dchs1* tiene un patrón de expresión generalizado mientras que el de *dchs2* está mucho más restringido (Rock y cols., 2005). En el laboratorio quisimos investigar si la complejidad transcripcional

del gen *dachsous* de *Drosophila* también se daba en los genes homólogos de vertebrados. Para ello, utilizamos ARN total de cócleas (oído interno) procedentes de ratones de estadios E18 y P3.

Previamente la información encontrada en la bases de datos (EMSEMBL) mostraba dos anotaciones diferentes para *dchs1*, correspondiente a dos ADNc de 10,763 pb y 4574 pb que codificarían proteínas de 3298 y 206 aminoácidos respectivamente. La primera contiene todos los dominios de la proteína Ds embrionaria, mientras que la segunda sólo contiene la región citoplasmática. En el caso de *dchs2* de ratón, la información encontrada en la bases de datos NCBI es más ambigua, y existe una secuencia ADNc anotada de 8529 pb; al analizar las posibles fases de lectura se encuentra un codón de terminación que daría lugar a una proteína truncada que contiene sólo 221 aminoácidos (633 pb) de la región extracelular.

### 5.1 Análisis transcripcional

Para esclarecer la posible transcripción de *dchs2* diseñamos cebadores que flanquean la región donde se encontraba el codón de terminación; para este análisis se emplea ADNc generado a partir de ARN procedente de cóclea de E18. Al secuenciar el fragmento obtenido vemos que los resultados



**Figura R19:** Esquema del gen *dchs2* de ratón. En la parte superior se muestra la composición de exones de acuerdo al ADNc anotado en la base de datos. En la parte inferior ADNc de *dchs2* deducido por secuenciación a partir de tejido de cócleas de ratón. Se observa la ausencia de algunos de los exones anotados en la base de datos (barras rosadas). Se han identificado dos variantes transcripcionales del exón 19 que elimina parte de la secuencia de la región citoplasmática.

muestran un error en la secuencia anotada. Para comprobar la secuencia completa secuenciamos por partes el ADNc a partir de fragmentos solapantes de ADNc, como se había hecho con *dachsous* de *Drosophila*. Los resultados muestran que algunos de los exones anotados no se encuentran en las



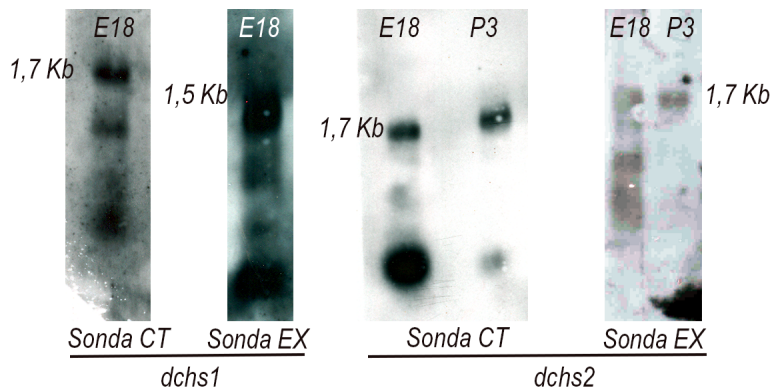
secuencias analizadas y el ADNc de *dchs2* pasa de tener 29 exones a 19 (Figura R19). Los exones 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13 y 14 correspondientes al ADNc anotado no forman parte de la secuencia de *dchs2* secuenciada. No se ha podido confirmar ni descartar la existencia del exón 1 porque para los experimentos con la técnica RACE 5' el diseño de cebadores en esta región no ha sido eficaz. Sorprendentemente, la RT-PCR del exón 29 (o 19 nuevo) da lugar a dos fragmentos de ADN de diferente tamaño. Uno de ellos contiene la secuencia completa correspondiente a la región transmembrana (incluyendo el dominio transmembrana y la región 3'UTR), y la otra secuencia que pierde 430 pb de la región citoplasmática. Esta segunda forma, mantiene el dominio de transmembrana y la región 3'UTR (Figura R18). En *dchs1*, analizando por PCR el exón correspondiente a la región citoplasmática, también encontramos dos formas diferentes una secuencia con toda la región citoplasmática y otra con que a diferencia de la segunda forma de *dchs2*, contiene región transmembrana y 3'UTR pero carece de región citoplasmática. El hecho de que en ambos casos exista un exón alternativo no descrito para la región citoplasmática nos sugiere la posibilidad de que haya varias isoformas tanto de *Dchs1* como de *Dchs2* en el ratón.

Estos resultados confirman que los genes *dchs1* y *dchs2* se expresan en el oído interno de ratón. El ADNc más largo de *dchs2* predecible a partir de clones solapantes tiene un tamaño de 7,9 Kb y da lugar a una proteína con 22 dominios de caderina en la región extracelular, un dominio transmembrana y una región citoplasmática. Además, estos datos muestran la existencia de dos variantes en ambos genes para la región citoplasmática, aunque no se ha podido determinar la estructura completa de las correspondientes isoformas.

### 5.2 Análisis por northern blot de *dachsous1* y *dachsous2* en el oído interno de ratón

Una vez conocidas las secuencias de *dchs1* y *dchs2*, quisimos analizar la expresión mediante la técnica de northern blot (Figura R20). Para ello se extrajo ARN total de cócleas de dos estadios diferentes del desarrollo de ratón: E18 y P3. Se diseñaron dos sondas de ARN distintas, de forma similar a *ds*, que corresponden a secuencias de la región citoplasmática (CT) y la región extracelular (EX) respectivamente.

Tanto en el caso de *dchs1* como en el de *dchs2* se observa la presencia de varias bandas, lo que sugiere la expresión de diferentes isoformas transcripcionales para cada gen aunque los resultados, a diferencia de lo encontrado para *ds*, no permiten conocer si hay isoformas con sólo la región citoplasmática o la región extracelular. Resulta sorprendente que el tamaño de la banda de mayor tamaño (1,7 kb) en ambos genes sea mucho menor que el ADNc descrito en la base de datos o predicho, en el laboratorio, por secuenciación de clones solapantes. Por otro lado, se observa que el



**Figura R20:** Expresión de diferentes isoformas de *dchs1* y *dchs2* en oído interno de ratón. Northern blot con ARN total de cócleas de ratón de los estadios E18 y P3. Dos ribosondas distintas que hibridan con la región citoplasmática (CT) o la region extracelular (EX) revelan un patrón de bandas diferente en función del estadio del tejido.

patrón de bandas de *dchs2* varía en diferentes momentos del desarrollo.

Los resultados del análisis de RT-PCR del exón 19 de *dchs2* y del estudio por northern blot muestran que, al igual que el gen *ds* de *Drosophila*, sus homólogos *dchs1* y *dchs2* de ratón expresan diferentes isoformas reguladas durante el desarrollo, lo que indica que la

complejidad de la regulación transcripcional está conservada entre especies.

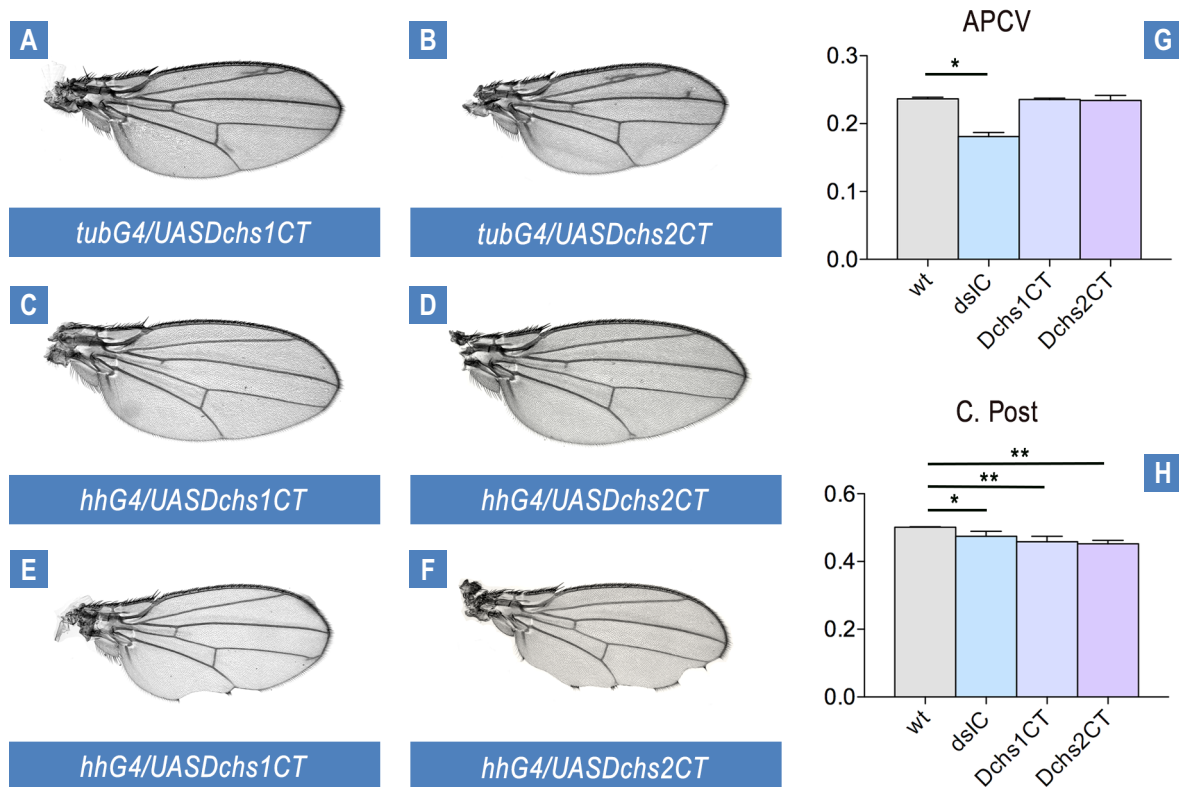
### 5.3 Homología funcional de las regiones citoplasmáticas de *Dachsous*, *Dachsous1* y *Dachsous2*

Dada la importancia funcional que tiene la región citoplasmática de *Ds* quisimos realizar un estudio fenotípico de las regiones citoplasmáticas de *Dchs1* y *Dchs2* para intentar establecer cuál de ellas presenta mayor homología funcional con la proteína de *Drosophila*.

Para este análisis generamos líneas transgénicas de moscas que expresan la región citoplasmática de *Dchs1* (*Dchs1CT*) y *Dchs2* (*Dchs2CT*) ancladas a la membrana mediante el dominio de transmembrana. Se utilizaron las líneas hhG4 y tubG4 (generalizada) para medir los parámetros  $R_1$  y  $R_2$  de las alas *Dchs1CT* y *Dchs2CT* y compararlos con los producidos por la sobreexpresión de *DsIC* (Figura R21).

A primera vista las alas que sobreexpresan *Dchs1CT* y *Dchs2CT* muestran extravenas en L2 pero no producen un cambio en la distancia entre las venas ACV y PCV como se observa con *DsIC* o en los mutantes *ds*. Sin embargo, sí se observa una reducción del tamaño del compartimento P igual o mayor al que produce la sobreexpresión de *DsIC*, lo que sugiere que el efecto dominante negativo que *DsIC* ejerce sobre la proliferación y en el patrón de venas se conserva en *Dchs1CT* y *Dchs2CT*.

Por último, algunas de las alas analizadas presentan un fenotipo con pérdida de tejido en el borde posterior del ala. Este fenotipo característico de mutaciones en las vías de Notch y Wg sugiere que la sobreexpresión de estas formas interfiere con estas vías probablemente secuestrando algún componente compartido entre las vías de *Ds*, Notch y Wg.



**Figura R21:** Sobreexpresión de la región citoplasmática de Dchs1 y Dchs2. La sobreexpresión de las formas Dchs1CT y Dchs2CT reproduce el fenotipo (dominate negativo) de crecimiento del ala observado con DsIC. En algunos casos también se observa defectos en el borde D/V del ala que recuerdan a fenotipos de falta de función de la vía de Notch. **G y H)** Representación grafica de los ratios  $R_1$  (APCV) y  $R_2$  (C. Post) de la sobreexpresión de las formas DsIC, Dchs1CT y Dchs2CT con respecto al *wt* utilizando la media con SEM (error estándar de la media). Diferencia estadísticamente significativa \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.04$ ), \*\*\* ( $p < 0.03$ ).

Estos resultados indican que Dchs1 y Dchs2 se comportan parcialmente como Ds. Aunque ambas proteínas muestran fenotipos similares a DsIC o DsFL, ninguno los reproduce completamente siendo destacable la ausencia del fenotipo asociado con la función de la PPC ( $R_1$ ).

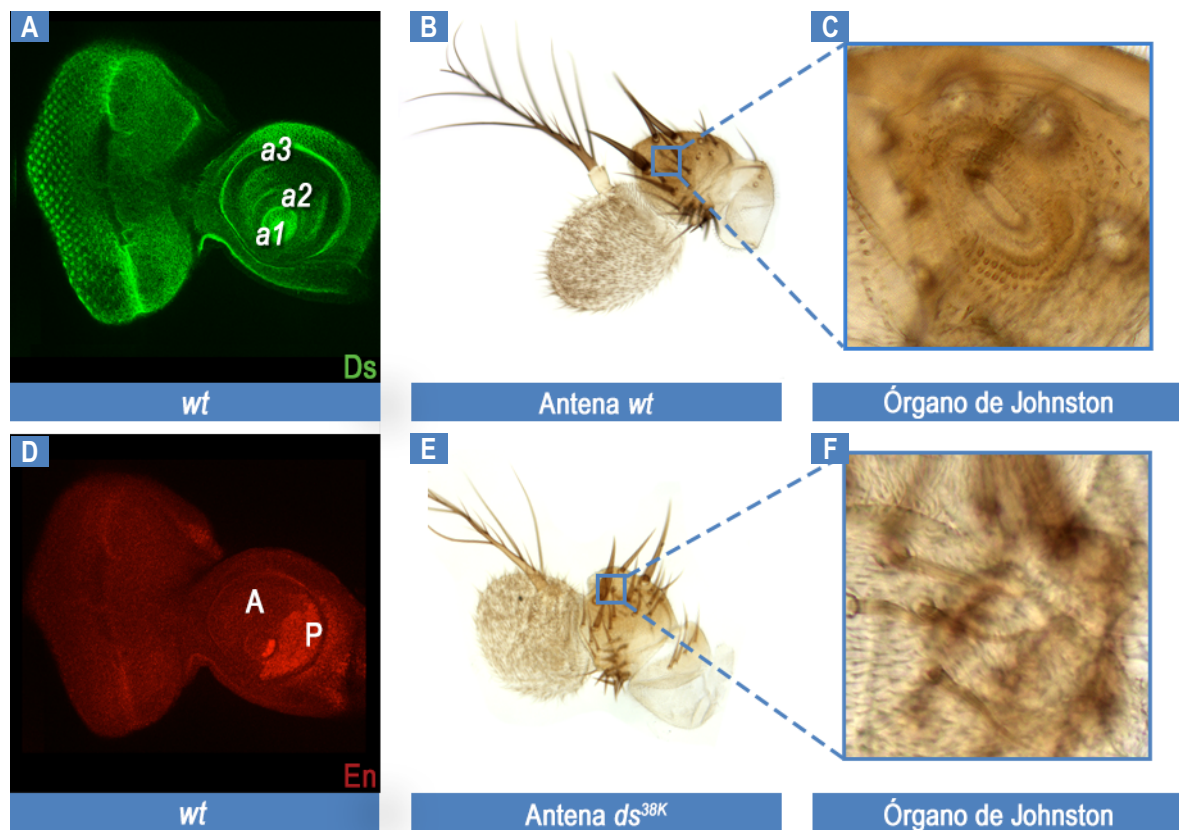
Con estos datos no podríamos decir cuál de ellos es el homólogo de Ds en el ratón. Sin embargo, sí podemos afirmar que además de los dominios conservados deben de existir en la secuencia de Ds características estructurales que son importantes para ejercer su función y que no se encuentran presentes en Dchs1 y Dchs2.

## 6. Función de Dachous en el desarrollo del órgano de Johnston

El sistema auditivo de *Drosophila* es el órgano de Johnston (OJ), un órgano cordotonal que se encuentra en el segundo segmento antenal y está formado por aproximadamente 200 escolopidias (Eberl y cols., 2007). Para la correcta formación del OJ se han identificado cuatro genes esenciales:

el gen proneural *atonal* (*ato*), necesario para la formación de los precursores de órganos sensoriales (POS, y los genes *spalt* (*sal*), *spalt-related* (*salr*) y *cut* (*ct*), necesarios para la formación de los elementos cuticulares esenciales para el anclaje de las escolopidias (segmentos y uniones antenales) (Göpfert y cols., 2002; Dong y cols., 2003; Ebacher y cols., 2007).

Las células precursoras de los órganos cordotonales se diferencian a partir de un conjunto de células denominado grupo proneural que expresan el gen *ato* a través de un mecanismo denominado inhibición lateral en el que participa la vía de Notch. Notch también participa en otras etapas de este proceso como es la formación de las uniones antenales similares a los segmentos tarsales (Tajiri y cols., 2011). La actividad de la vía de Notch (N) se inicia con la unión de los ligandos Serrate y Delta que provocan el procesamiento o la proteólisis de la región citoplasmática. Este fragmento proteolizado pasa al núcleo, donde se une a otros co-activadores, como Supresor of Hairless (Su(H)) y Mastermind (Mam), para activar la expresión de diferentes genes diana, como el complejo génico

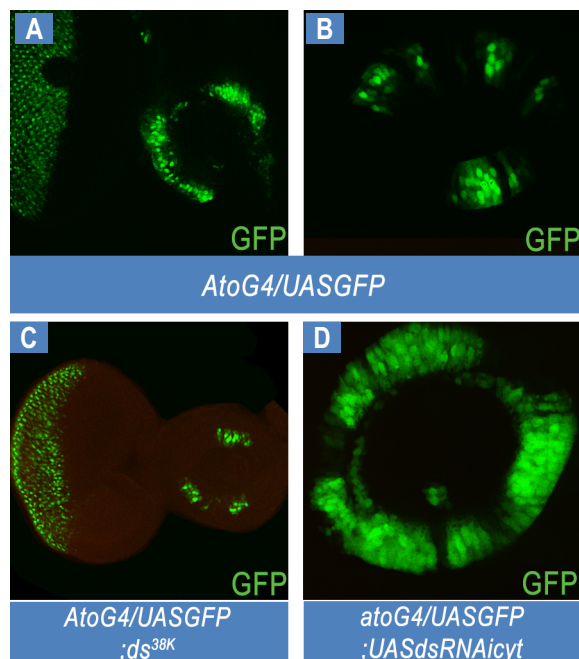


**Figura R22:** Función de *ds* en la formación del órgano de Johnston. **A)** expresión de la proteína Ds en el disco de ojo antena. Al comparar las antenas de un individuo silvestre (**B**) y *ds*<sup>38K</sup> (**E**) se observa defectos en la forma y tamaño con la presencia de quetas (organos sensoriales) ectópicas. (**C, F**) Las imágenes amplificadas de una región del segmento antenal a2 muestra defectos en la estructura del órgano de Johnston.

*Enhancer of split* (*E(spl)*) o *big brain* (*bib*), dependiendo del contexto celular (Schweisguth y cols., 2004; Bray y cols., 2006).

Por otra parte, existen proteínas citoplasmáticas, como Deltex (Dx) y Dsh, que actúan como moduladores de la actividad de N modificando su afinidad por los factores de transcripción a los que se une (Matsuno y cols., 1995; Romain y cols., 2001; Collu y cols., 2012).

### 6.1 Alteraciones de la antena y el órgano de Johnston en mutantes *dachsous*



**Figura R23:** Ds regula la expresión de *ato* en el disco de antena. El disco de antena mutante *ds* (*ds<sup>38K</sup>*) produce una reducción en el número de células que expresan *ato* con respecto a discos con comportamiento silvestre (*AtoG4/UASGFP*) del mismo estadio. La sobreexpresión tardía de *dsRNAicyt* (*atoG4*) producen un incremento del número de células que expresan *ato*. Los fenotipos de falta de función de *ds* recuerdan a los observados en algunas mutaciones de la vía de Notch.

Ds se expresa en el disco de ojo-antena, tanto en los fotorreceptores (R) que forman los omatidios del ojo compuesto del insecto adulto como en los segmentos de la antena. La correcta orientación de las células fotorreceptoras depende de Ds y N (Yang y cols., 2002). Sin embargo, nunca se ha estudiado la función de *ds* en la formación de la antena.

Las antenas *ds<sup>38K</sup>/ds<sup>36D</sup>* son más pequeñas, y los segmentos presentan una forma más redondeada y el número de macro y microquetas (órganos sensoriales) es mayor que en antenas control (*wt*) (Figura 22). En un porcentaje pequeño de moscas (25%), el OJ tiene un tamaño menor y una morfología alterada. Además, las moscas mutantes *ds* son atáxicas (descoordinación al caminar) y no pueden volar (alas desplegadas permanentemente), dos rasgos indicativos de defectos en la función de los órganos cordotonaes que se localizan en las patas (fémur) y el ala (axila) del insecto adulto

(Todi y cols., 2004; Eberl y cols., 2007).

El conjunto de estas observaciones, y el hecho de que la PPC sea un mecanismo importante en el desarrollo del oído interno de mamíferos, nos llevó a estudiar la función de Ds en la formación del órgano de Johnston.

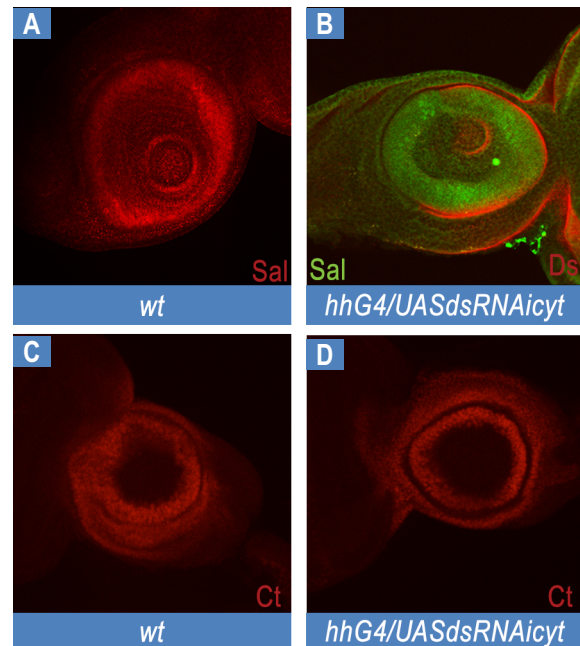


## 6.2 Función de *dachsous* en la formación de los órganos cordotonaes

Mutaciones de *ds* producen alteraciones en la estructura del OJ del insecto adulto con una baja penetrancia. A continuación analizamos la expresión de *ato* en discos *ds<sup>38K</sup>/ds<sup>36D</sup>*. *Ato* se expresa en los POS y en las 4 células que derivan de él y que forman la escolopidia (Jarman y cols., 1993). En el disco de antena de larva III se expresa en 3 grupos grandes de POS dentro del segmento presuntivo de a2. Los territorios de los discos *ds<sup>38K</sup>/ds<sup>36D</sup>* correspondientes a la antena son mas pequeños que en el control, y el número de POS que expresan *ato* (*atoG4/UASGFP*) disminuye de manera drástica. Sorprendentemente, el número de discos que presentan este fenotipo es mucho mayor que en adultos (80%) (Figura R23). Por el contrario, la eliminación de la función de *ds* en etapas posteriores (*atoG4/UAS-dsRNAicyt*) produce un incremento en el número de células que expresan *ato*, lo que sugiere que el número

de células derivadas del POS aumenta. Estos resultados recuerdan a los fenotipos causados por defectos en la vía N, un gen que participa en la inhibición lateral tanto en la especificación del POS como posteriormente en las 2 divisiones diferenciales (Dietrich y cols., 1984; Heitzler y cols., 1991).

Con estos datos podemos concluir que *ds* regula la expresión de *ato* durante la formación del órgano de Johnston.



**Figura R24:** Dachsous controla la formación de los segmentos antenales a través de la expresión de *sal/salr*. La sobreexpresión de dsRNAicyt en el compartimento P del disco de antena vemos que se produce una reducción de la expresión de *sal/salr* (A y B); mientras que la expresión de *ct* permanece inalterada (C y D).

## 6.3 Dachsous en la formación de los elementos cuticulares del órgano de Jonhston

Mutaciones en *ds* también provocan problemas estructurales en la antena. Los componentes cuticulares que forman el OJ son esenciales para el correcto anclaje de las escolopidias en la unión a2/a3 (Figura R24). Por tanto, el siguiente paso fue analizar la expresión de *sal/salr* y *ct*. *sal/salr* además de una función en la diferenciación y el mantenimiento de los órganos cordotonaes del OJ (Dong y cols. 2003), juega un papel esencial en la formación de la antena. Mutaciones en *ct* producen defectos

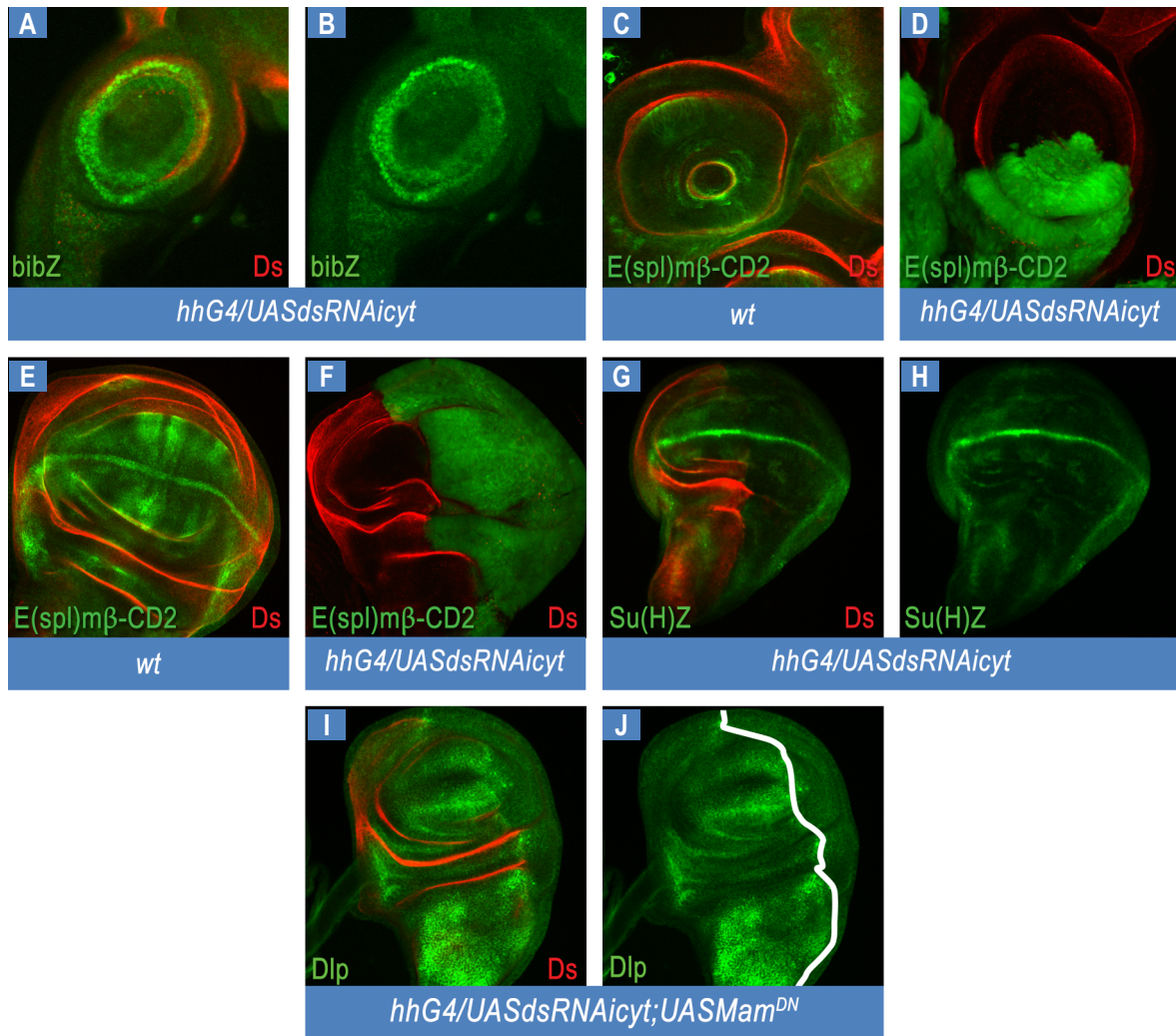


en la unión a2/a3 que impiden el anclaje correcto del órgano cordotonal y provoca su degeneración (Ebecher y cols., 2007).

Para analizar si *ds* regula la expresión de estos genes examinamos la expresión de las proteínas Sal y Ct en discos *hhG4/UAS-dsRNAicyt* (Figura R24). Con Sal se observa una ligera disminución de la expresión en las células del compartimento P mientras que la expresión de Ct no parece estar afectada.

### 6.4 Interacción entre *dachsous* y la vía de Notch

Los resultados con *ato* en discos *ds<sup>38K</sup>/ds<sup>36D</sup>* sugieren que *ds* podría estar modulando la actividad de N. La disminución de los POS recuerda los fenotipos de ganancia de función de N como en los alelos *Abruptex* y *N<sup>Mcd</sup>*, o la sobreexpresión de *Deltex* (Brennan y cols., 1999; Romain y cols., 2001; Matsuno y cols., 1995). Para estudiar si *ds* regula la vía de Notch analizamos la expresión de *bib* y *E(spl)mb* y *Su(H)*, en discos de ala u ojo-antena del genotipo *hhG4/UAS-dsRNAicyt* (Figura R25). Mientras que la expresión de los genes dianas *bib* y *E(spl)mb* están sobreexpresados lo que indica un incremento de la actividad de N, la expresión del cofactor *Su(H)* parece no estar afectada en el compartimento P, donde se ha eliminado la actividad de Ds. Finalmente para confirmar que la actividad de N es un mediador de la función de Ds a través de la vía de Hippo, coexpresamos *dsRNAicyt* y una forma dominante negativa del coactivador *mam* (*mam<sup>DN</sup>*) y analizamos la expresión de *Dlp*. En los discos de ala *hhG4/UAS-dsRNAicyt;UAS-mam<sup>DN</sup>*, el sobrecrecimiento producido por la falta de Ds en el compartimento P pasa a reducirse drásticamente y la expresión de *Dlp* no es detectable. Estos resultados, aunque mas graves, recuerdan a los fenotipos descritos cuando se elimina una copia de *dsh* o se sobreexpresa *Nkd* y sugieren que Dsh puede ser el factor común que conecta ambas vías (comparar con la Figura 17).



**Figura R25:** Ds regula la vía de Notch. La eliminación de las isoformas Ds mediante la expresión de dsRNAicyt provoca la desregulación de algunos componentes de la vía de N en disco de antena y de ala. La expresión de *bibZ* (A,B) y *E(spl)mβ-CD2* (C, D, E y F) está incrementada en células *ds* mutantes. Sin embargo los niveles de expresión *Su(H)* parece no modificarse o muestran una ligera bajada en el compartimento posterior de ala (G, H). La falta de actividad de Notch (*mam<sup>DN</sup>*) revierte los fenotipos de sobrecrecimiento observados al expresar dsRNAicyt en el compartimento P y elimina la expresión de *Dlp* uno de los genes diana de la vía de Hippo (I,J).





## DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN



El gen *ds* de *Drosophila melanogaster* se describió por primera vez en 1926 debido a que sus mutantes presentan alteraciones como patas y alas más acortadas (Stern y Bridges, 1926). Posteriormente, en diferentes estudios genéticos para buscar genes (*screening*) relacionados con el crecimiento y la PPC han ido apareciendo otros alelos *ds* (Adler, 1998). La mayor parte de los estudios sobre el gen *ds* se han centrado en su función en PPC, debido a la baja viabilidad de los alelos fuertes, que son los que también afectan procesos de proliferación y formación de patrón (diferenciación de territorios). La incorporación de nuevas herramientas genéticas (clones FRT/FLP, Gal4/UAS, ARNi) ha permitido en los últimos años ampliar el conocimiento acerca de la función de Ds en proliferación celular. En el mecanismo de PPC, Ds forma parte, junto con la caderina Ft y la quinasa Fj, de uno de los dos módulos que producen la señal polarizante. Siguen sin identificarse la mayoría de los componentes del módulo Ds/Ft. En el modelo actual de PPC se ha establecido que Ds y Ft forman heterodímeros entre células vecinas. La propagación direccional de la señal polarizante depende de la afinidad entre Ds y Ft modulada por Fj, de manera que Ds actúa como ligando, a través de su región extracelular y Ft es el receptor. Sin embargo, resultados derivados de otros estudios genéticos relacionados con la PPC y con la proliferación ponen en cuestión la función asignada a Ds como ligando (Casal y cols., 2006; Baena-López y cols., 2008; Willecke y cols., 2008; Degoutin y cols., 2013). En el abdomen, la sobreexpresión en clones de la región extracelular de Ds en un fondo *ds<sup>-</sup>* es incapaz de revertir la polaridad de las quetas en células adyacentes al clon a pesar de que Ft está presente (Casal y cols., 2006). Del mismo modo clones mutantes *ds* modulan la actividad de Hippo



sólo en las células dentro de clon (autónomo) (Baena- López y cols., 2008). Para tratar de resolver estas discrepancias entre los datos genéticos y los datos moleculares publicados nos planteamos realizar un análisis molecular más detallado del gen *ds*.

### La compleja regulación del locus de *dachsous*

Durante los últimos años, el conocimiento sobre el transcriptoma de *Drosophila* ha aumentado exponencialmente. A pesar del alto grado de conocimiento sobre el genoma acumulado en este animal modelo, en 2011 se describieron aproximadamente 2000 nuevas regiones susceptibles de transcribirse (NTR, de sus siglas en inglés *New Transcribed Regions*) (Graveley y cols., 2011). En este estudio también aparecen muchos de los genes que se pensaba que tenían un solo producto de transcripción; incluso un complejo génico tan extensamente estudiado durante décadas, como es *bithorax*, presentaba un NTR. Estos datos y otros estudios posteriores (Brown y cols., 2014) abren la puerta a que muchos de los genes con los que se trabaja como codificadores de proteínas únicas, se puedan estar expresando de una forma más compleja. De hecho, los mismos autores, proponen que la complejidad transcripcional de muchos genes conocidos, no detectados en el *screening*, es mayor de lo que se conoce actualmente. Este es el caso de *ds*, el gen de interés en este estudio.

La información publicada describe un único ADNc de gran tamaño (12 Kb) procedente de clones solapantes obtenidos de una genoteca embrionaria (Clark y cols., 1995). En el mismo estudio se menciona la existencia de otras bandas detectadas por northern blot aunque se concluye que *Ds* codifica una única proteína (DsFL: 3543 aminoácidos).

A lo largo del trabajo experimental de esta tesis, los resultados obtenidos demuestran que la regulación del gen *dachsous* es mucho mas compleja de lo que se había descrito hasta ahora.

Experimentos como el northern blot y el RACE muestran que en los discos imaginales y el cerebro se expresan diferentes isoformas transcripcionales de *ds* de menor tamaño que la descrita en embriones. Aunque, no podemos descartar la posibilidad de que algunos de estos ARN sean no codificantes, hemos podido identificar tres nuevas isoformas que carecen de dominio de transmembrana: DsEx y Ds1, que codifican dos nuevas proteínas con parte de la región extracelular, y DsIntra, que sólo contiene la región citoplasmática. Debido a las limitaciones de la técnica RACE no se ha podido conocer la estructura exónica de otras isoformas detectadas por northern blot y que contenían ambas regiones. Los resultados del RACE también han proporcionado información acerca de nuevos exones que coinciden parcialmente con exones ya descritos previamente, como son el exón 10B (con un codón de terminación al final del exón 10 inicial), el exón 12B (que codifica únicamente la

región citoplasmática) y el exón 12C (con la parte final del exón 12 original).

Resultados publicados previamente habían propuesto que las diferentes bandas detectadas mediante western blot por el anticuerpo Ds eran debidas al procesamiento proteolítico de la proteína DsFL (Ambegaonkar y cols., 2012). Sorprendentemente, y contrario a nuestros resultados de RT-qPCR, ellos detectan en discos imaginales unos niveles de proteína DsFL semejantes a los de otras bandas de menor tamaño. A esta conclusión se llega tras una búsqueda *in silico* de motivos susceptibles de procesamiento por proteasas dentro de la secuencia de la proteína Ds, sin ningún dato experimental que lo demuestre. No obstante, no podemos descartar esta posibilidad, y en cualquier caso sería un nivel de complejidad añadido al aportado en este trabajo.

Además de la expresión de diferentes isoformas de Ds, existe también una regulación espacio-temporal de estas isoformas a lo largo del desarrollo. Esto ocurre a través de elementos cis-reguladores localizados en las regiones intrónicas del locus. Experimentos con las líneas Janelia, junto con la caracterización de la lesión molecular de algunos alelos fuertes ( $ds^{05142}$  y  $ds^{36D}$ ), demuestran que el intrón 2 juega un papel esencial en esta regulación y explicaría el gran tamaño del locus (más de 120 Kb de secuencia genómica). Por otro lado, los resultados de la RT-qPCR y de la técnica de western blot (bandas adicionales) obtenidos en diferentes condiciones mutantes sugieren la existencia de una regulación cruzada entre distintas isoformas. Esta hipótesis está basada en el incremento de los niveles del exón 2 observado en el análisis de RT-qPCR de los alelos reguladores  $ds^{38K}$  y  $ds^{36D}$  y concuerda con los niveles de proteína detectados con el anticuerpo Dsexc (exones 2-3) en  $ds^{38K}$ .

Las líneas Janelia también han permitido mostrar el momento del desarrollo y el territorio en que algunas isoformas de Ds ejercen su función. Por ejemplo, las isoformas que contienen la región citoplasmática no son indispensables en la región dorsal del disco de ala de larva III (*hinge*) donde *ds* se expresa a niveles altos ( $ds^{05142}$ ). Sin embargo, la eliminación transitoria de estas isoformas en etapas más tempranas (GMR19B05) es suficiente para producir todas las alteraciones descritas en alelos *ds* fuertes (proliferación, patrón de venas y PPC), lo que indica que para todas estas funciones la expresión de Ds es necesaria en etapas más tempranas, incluso para la desorientación de los tricomas que se ha descrito que ocurre en la fase de pupa. No se puede descartar la existencia de un único mecanismo que controla todos los procesos, de manera que la afectación de unos u otros dependería del momento del desarrollo en que se interrumpe la función de Ds. En este contexto, tendría sentido que la expresión espacio-temporal de las diferentes isoformas de Ds variase según su función a lo largo del desarrollo embrionario y larvario de *Drosophila*. De acuerdo con esta hipótesis, las bandas detectadas mediante western blot son de distinto tamaño en tejidos procedentes de embriones y en discos imaginales. Además, los datos de RT-qPCR muestran que el ADNc embrionario (DsFL), si se

expresa en los discos imaginales, lo hace a unos niveles tan bajos que son indetectables, en nuestras condiciones, por western blot.

En conjunto, todos estos resultados demuestran un grado de complejidad desconocida hasta ahora en la regulación del gen *dachsous*. Dicha complejidad parece conservarse evolutivamente, al menos a nivel transcripcional, como indican los resultados de las técnicas de northern y RACE de los genes *dchs1* y *dchs2* de ratón, lo que apoya aun más su importancia funcional.

### Relevancia funcionalidad de las distintas isoformas de *Dachsous*

El gen *ds* participa en dos funciones claves durante el desarrollo: el mecanismo de PPC y el control de la proliferación celular, este último mediante la modulación de la actividad de Hippo.

Estudios previos asignan una función esencial a la región extracelular de Ds en la PPC (Matakatsu y cols., 2006; Casal y cols., 2006) y a la región citoplasmática en proliferación celular (Baena-López y cols., 2008).

La caracterización de las nuevas isoformas solubles DsIntra y DsEx nos llevó a estudiar su participación en la PPC y la proliferación celular en comparación con la proteína DsFL. El análisis de los fenotipos de ala y su cuantificación utilizando dos parámetros arbitrarios ( $R_1$  y  $R_2$ ) muestran un papel relevante de la región citoplasmática en ambas funciones. Los resultados muestran que la isoforma citoplasmática DsIntra reproduce los fenotipos de sobreexpresión producidos por DsFL. Por el contrario, el fenotipo producido por DsEx es mucho más débil y afecta sólo a la PPC, lo que indica que la relevancia de la región extracelular es menos importante.

Los resultados obtenidos con diferentes ARN interferentes apoyan también esta conclusión. La expresión de dsRNAiexc, a pesar de la dramática disminución de la expresión de los exones, causa un fenotipo débil, mientras que la expresión de dsRNAicyt causa fenotipos muy fuertes.

No obstante, estos resultados no permiten asignar una función a cada una de las isoformas expresadas. La cantidad de proteína detectada con el anticuerpo Dsex en los discos dsRNAiexc sugiere la presencia de otras isoformas no eliminadas que tienen parte de la región extracelular (sin el exón 6). Por el contrario, la expresión de dsRNAicyt elimina tanto la proteína detectada con el anticuerpo Dsex como con Dscyt. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos mediante la técnica de northern blot.

Para poder estudiar por separado la función de cada una de las isoformas, sería necesario diseñar nuevos ARNi que interfieran con exones específicos contenidos en cada una de las isoformas, y con los datos de que disponemos a día de hoy no es posible.

## Dominios de la región citoplasmática y nuevos componentes que participan en la polaridad planar celular y la proliferación celular

El análisis funcional de la región citoplasmática de la proteína Ft ha permitido identificar diferentes dominios, algunos relacionados con su función en la PPC y otros que modulan la actividad de Hippo. Además, los autores proponen la posibilidad de un tercer mecanismo de Ft que participa en el control del crecimiento independientemente de la vía de Hippo (Pan y cols., 2013; Zhao y cols., 2013; Matakatsu y Blair, 2012).

Una vez establecida la importante función de la región citoplasmática de Ds, quisimos conocer si, como ocurre en Ft, existen dominios independientes que participan en cada una de las funciones de Ds.

El análisis de sobreexpresión de varias formas de Ds de las que se han eliminado 5 dominios conservados (DslCΔ) ha proporcionado algunos resultados preliminares. Los resultados muestran la existencia de dominios discretos que participan sólo en la PPC (dominio 1) o sólo en el control de la proliferación celular como el (dominio 2), y otros que son necesarios para ambas funciones (dominios 3 y 4).

En algunos casos la eliminación del dominio provoca un agravamiento de fenotipo de proliferación en lugar de una recuperación del tamaño; este resultado es difícil de interpretar en un fenotipo dominante negativo causado por sobreexpresión. Sin embargo, en todos los casos en que la expresión de DslCΔ altera la proliferación se observan cambios en la expresión de exZ lo que concuerda con una función del dominio en el control de la actividad de Hippo. No obstante, para poder establecer una relación entre los dominios y las funciones de Ds serán necesarios otros experimentos complementarios, como la generación de formas truncadas de DslC eliminando dominios desde el extremo 3', o la eliminación de los dominios conservados mediante mutagénesis.

Los datos *in silico*, además de mostrar la existencia de diferentes dominios en la región citoplasmática de Ds, ha permitido identificar motivos de unión PDZ y varios residuos serina/treonina fosforilables. En paralelo, iniciamos la búsqueda de nuevos componentes de la vía de Ds/Ft mediante un análisis genético, lo que nos ha permitido seleccionar potenciales candidatos como las proteínas Arc y Dsh, con dominios PDZ, y la quinasa Nmo. Los resultados de nuestro estudio muestran una interacción genética entre Ds y las proteínas Dsh, Arc y Nemo. Los presentes resultados demuestran que Dsh, además de su función en la PPC dentro de la vía de Fz/Fmi, también participa como mediador entre Ds y la vía de Hippo en la función de proliferación celular. Esta función de Dsh tiene lugar a través del dominio PDZ, como lo demuestran los resultados de sobreexpresión de Nkd que mimetizan los fenotipos producidos por la eliminación de una copia de Dsh. En el caso de Arc y Nemo, los fenotipos

de las alas mutantes indican que ambas proteínas son necesarias para las funciones de proliferación celular y PPC. Estos resultados son la primera evidencia que relaciona a Arc con la vía de Ds/Ft. Los fenotipos de la interacción entre Nemo y Ds son semejantes a los de Arc. Diferentes estudios han demostrado que Nemo es necesario para la rotación de los omatidios en el ojo de *Drosophila* (Fiehler y cols., 2008) y el desarrollo del ala (Verheyen y cols., 2001). La falta de función de *nemo* produce un fenotipo similar a los producidos por mutantes *ds*. Los resultados publicados muestran evidencias indirectas que refuerzan nuestros datos acerca de la participación de Nemo en la PPC a través de la vía de Ds/Ft. Para poder determinar si existe una interacción física entre estas proteínas y el dominio citoplasmático de Ds será necesario realizar ensayos de coimmunoprecipitación.

### Importancia funcional de la localización subcelular de Dachsous

La correcta localización subcelular de una proteína es esencial para llevar a cabo su función. Los mayores niveles de proteína Ds, utilizando diferentes anticuerpos, se localizan en la región subapical de la membrana.

En discos mutantes observamos una correlación entre la deslocalización de la proteína detectada con el anticuerpo citoplasmático y la gravedad de los fenotipos observados. Al examinar la distribución de la proteína Ds con dos anticuerpos diferentes Dsex y Dscyt vemos que en los alelos fuertes (*ds<sup>38k</sup>*) no se detecta proteína en la región apical detectada con Dscyt mientras que en un mutante débil (*ds<sup>1</sup>*) la proteína detectada es similar a la de los discos control. Sin embargo, en ambos casos se observa expresión difusa con Dsex.

Además, al hacer un corte ortogonal en el disco imaginal también se observa una expresión punteada en el citoplasma, que sólo se detecta con el anticuerpo Dscyt y que corresponde a proteína Ds no anclada a la membrana. La ausencia de tinción punteada con el anticuerpo Dsex indica que esta proteína no se produce por el reciclaje de la proteína localizada en la membrana y sugiere una función de Ds fuera de la localización apical, que podría ejercerse a través de la isoforma soluble Dsintra.

### Función de Dachsous en la formación del órgano de Johnston

La sordera es el defecto sensorial que impide la correcta transformación del sonido en un impulso eléctrico que se transmite al cerebro. Dentro de los tipos de sordera el 50% de los casos diagnosticados son sorderas genéticas causadas por diferentes tipos de mutaciones que pueden provocar defectos en el desarrollo del oído interno y afectan a la cóclea, la organización de los

estereocilios o la transmisión de la señal eléctrica al cerebro. (Kochhar y cols., 2007). Uno de cada 1000 niños presentan sordera grave o profunda en el momento del nacimiento o durante la primera infancia (Morton, 1991).

En los mamíferos, el estudio de la PPC y el desarrollo del oído interno avanzan en paralelo debido a que muchos de los genes implicados en la PPC tienen una función esencial en el desarrollo del oído interno. En *Drosophila*, a pesar de ser un modelo de referencia para estudiar la PPC, no se sabe si este mecanismo participa en la formación del órgano auditivo llamado órgano de Johnston. Pese a las diferencias anatómicas del órgano auditivo entre insectos y vertebrados ambos proceden de un ancestro común y muchos de los genes que participan tanto en la formación de las estructuras nerviosas que forman el órgano auditivo como en la transmisión de la señal eléctrica al cerebro están conservados (Bechstedt y cols., 2008). En este trabajo demostramos que Ds, una proteína esencial en la PPC, participa en el desarrollo del OJ. Estos resultados abre una nueva vía de investigación centrada en la relación con la PPC y la identificación de nuevos genes implicados en las sorderas genéticas.

Ds se expresa en el disco de ojo-antena y durante la formación del OJ, controla la expresión de *ato*, el gen proneural que especifica las escolopidias que forman el órgano sensorial (cordotonal). También regula la expresión de la proteína Sal, que es necesaria para la formación de las estructuras cuticulares (segmentos a2 y a3) donde se anclan las escolopidias para que la vibración detectada en la arista de la antena se transmita correctamente al cerebro. El estudio genético utilizando diferentes combinaciones mutantes de ds y de la vía de Notch, indica que la actividad de N es necesaria para la función de Ds durante la formación del OJ y para el control de la proliferación celular durante el desarrollo del ala. El análisis de la expresión de los genes *bib* y *E(spl)* muestran que la falta de función de Ds incrementa los niveles de actividad de la vía de N y esta alteración de la regulación produce un cambio en la actividad de la vía de Hippo. La relación entre las vías de N y la PPC se ha descrito en otros contextos del desarrollo de *Drosophila*, como en el ojo (Yang y cols., 2002) y la pata (Capilla y cols., 2012) aunque asociada a la vía de Fz/Fmi. Curiosamente mutaciones en las vías de Fz/Fmi y de Ds/Ft producen efectos opuestos en la formación de las uniones tarsales; la primera produce uniones tarsales ectópicas (Capilla y cols., 2012) y la segunda impide la completa formación de las mismas (Rodríguez, 2004), aunque ambas provocan un incremento de la actividad de la vía de N.

Los resultados de esta tesis indican que Ds regula la vía de N y que esta regulación debe ser independiente de la vía de Fz/Fmi porque regula la proliferación celular y el patrón de venas. Datos publicados demuestran que la señal de N activa de forma no autónoma la vía de Hippo en el desarrollo del ala (Graves y cols., 2012).



La interacción entre Ds y Dsh sugieren que el incremento de la actividad de N observado en mutantes *ds* podría estar mediado por una variación en los niveles de Dsh. Dsh actúa como un activador de la vía de Wg y un inhibidor de la vía de Notch mediante la interacción con la región intracelular y la interferencia con el tráfico endocítico de N (Collu y cols., 2012; Capilla y cols., 2012). En condiciones de falta de función de *ds* observamos un incremento de la actividad de N y también una disminución de la actividad de Wg (Rodríguez, 2004). Por tanto, aunque no se ha observado una disminución en la expresión de *dsh* (*cos-dsh-GFP*), la falta de Ds impide la función de Dsh en general. Una posible explicación sería que los niveles de la proteína Dsh son menores, y otra sería que la menor capacidad de acción se deba a una incorrecta localización subcelular de Dsh en ausencia de Ds; recordamos que tanto la señalización de Wg como la endocitosis de N tienen lugar en la región apical de la membrana.











1. Durante la etapa larvaria de *Drosophila* el gen *ds* muestra una complejidad transcripcional no descrita en embriones, con la expresión de diferentes isoformas de ARN formadas a partir de diferentes inicios de transcripción.
2. En la regulación espaciotemporal de las isoformas de Ds participan elementos cis-reguladores localizados en las regiones intrónicas.
3. La complejidad transcripcional que se observa en el gen *ds* de *Drosophila melanogaster* está conservado evolutivamente, como lo demuestra la expresión de diferentes isoformas en los homólogos de ratón *dsch1* y *dchs2*.
4. Tres de las nuevas isoformas de Ds caracterizadas dan lugar a proteínas solubles como DsEx, Ds1 y DsIntra. Las dos primeras contienen solo región extracelular, y la tercera la región citoplasmática sin transmembrana. También ha permitido identificar nuevos exones que forman parte de algunas de estas isoformas.
5. Los fenotipos de sobreexpresión y de falta de función muestran que la relevancia funcional de la región extracelular de Ds es menor de lo que se propone en el actual modelo de PPC.
6. Los fenotipos producidos por la eliminación de las isoformas que contienen el dominio citoplasmático de Ds muestran la relevancia funcional de esta región tanto para llevar a cabo la función de polaridad planar como para el control de la proliferación celular a través de la vía de Hippo.
7. El análisis fenotípico de la forma DsIC y de las variantes DsICA, en las que se eliminan diferentes dominios conservados de la región citoplasmática, muestra la existencia de regiones discretas que participan en cada una de las funciones de Ds durante el desarrollo.
8. La expresión de Ds se localiza preferentemente en la región apical de la membrana pero también existen isoformas de Ds que se localizan en la región citoplasmática.
9. La función de Ds es necesaria para el correcto desarrollo del órgano auditivo de *Drosophila*. Ds participa en la especificación del órgano cordotonal y en la formación de los segmentos antenales regulando la expresión de los genes *atonal* y *spalt*.
10. Ds regula la expresión de Notch y Dsh. Mediante un mecanismo no conocido lo suficiente, ambas proteínas actúan como mediadoras en la modulación que Ds ejerce sobre la actividad de la vía de Hippo.









## 1. Herramientas genéticas

### 1.1 Estirpes de *Drosophila melanogaster*

Los alelos mutantes empleados en esta tesis están descritos en Flybase ([www.flybase.bio.indiana.edu](http://www.flybase.bio.indiana.edu))

- *yw* (*yellow white*) cepa utilizada para describir el fenotipo silvestre
- Alelos de falta de función y líneas lacZ:
- *ex<sup>k12913</sup>* (Bloomington), *ds<sup>1</sup>* (Bloomington), *30AGal4* (Matakatsu y Blair, 2006), *ds<sup>38k</sup>* (Bloomington), *ds<sup>05142</sup>* (Bloomington), *ds<sup>36D</sup>* (Rodríguez, 2004), *dally<sup>80</sup>* (Han, 2004), *dsh<sup>V26</sup>* (Bloomington), *nmo<sup>DB24</sup>* (Zeng, 2007), *nmo<sup>P1</sup>* (LacZ; Bloomington), *Df(2R)a<sup>EX1</sup>* (Bloomington), *a<sup>K11011b</sup>* (Bloomington), *Df(2R)a<sup>7</sup>* (Bloomington), *bib-LacZ* (Hao y cols., 2003), *E(spl)mβ1.5-CD2* (Cooper y cols., 2000) y *Su(H)-lacZ* (Barolo y cols., 2000).
- Estirpes transgénicas UAS:
- UAS-GFP (Bloomington)
- UAS-Nkd-Myc (Bloomington)
- UAS- *mam<sup>DN</sup>* (Kumar y Moses, 2001)
- UAS-DsFL contiene toda la región codificante de ds (exón 2 a 12) (Matakatsu, 2004).
- UAS-dsCT contiene el péptido señal, el dominio de transmembrana y la región citoplasmática (P. Giraldo, no publicado)
- UAS-DsIC contiene el dominio de transmembrana y la región citoplasmática (P. Giraldo, no



publicado)

- UAS-ectoDs contiene el péptido señal, la región extracelular y el dominio de transmembrana (exón 2 hasta parte del 12) (Casal y cols., 2006)
- *UAS-dsRNA<sup>i</sup>ex* (Vienna Drosophila RNAi Center)
- *UAS-dsRNA<sup>i</sup>cyt* (Vienna Drosophila RNAi Center )
- Estirpes transgénicas Gal4:
- *sal<sup>EPV</sup>-Gal4* (Barrio R, 2004), *hh-Gal4* (Bloomington), *638-Gal4* (Calleja, 1996), *tub-Gal4* (Bloomington) y *ato-Gal4* (Bloomington). También se emplearon las líneas Gal4 de la colección de Janelia con secuencias intrónicas de *ds* ([http://flystocks.bio.indiana.edu/pdfs/Janelia\\_seq.csv](http://flystocks.bio.indiana.edu/pdfs/Janelia_seq.csv)): GMR17G04, GMR17G12, GMR17H06, GMR18C04, GMR18D10, GMR18E03 y GMR19B05 (Bloomington) Estas líneas proceden de un *screen* realizado para encontrar elementos reguladores en el genoma completo de *Drosophila*. Cada línea contiene un fragmento de DNA genómico no codificante que dirige la expresión del gen Gal4 (Pfeiffer y cols., 2008)

### 1.2 Obtención de moscas transgénicas

Las nuevas estirpes transgénicas generadas durante el desarrollo de esta tesis, se clonan en el vector pUAS y se microinyectan en embriones *yw* antes de la celularización del blastodermo para su integración en la línea germinal (Christian Dahmann, 2008). Para cada construcción se seleccionaron inserciones en cromosomas diferentes para analizar el efecto de una expresión variable en los fenotipos.

Durante la tesis se han generado las siguientes líneas transgénicas:

- UAS-DsIntra-V5– Contiene la región citoplasmática de Ds sin dominio transmembrana y el epítipo V5 en posición Ct
- UAS-DsEx-GFP – Contiene la región extracelular sin región transmembrana (exones 1 a 10)
- UAS-DsCT $\Delta$ 1,DsCT $\Delta$ 2, DsCT $\Delta$ 3, DsCT $\Delta$ 4, DsCT $\Delta$ 1-4 – Contiene el péptido señal, el dominio transmembrana y la región citoplasmática con deleciones internas que eliminan diferentes dominios conservados
- UAS-Dchs1CT – Contiene el péptido señal, el dominio de transmembrana y la región citoplasmática de la proteína Dchs1 de ratón.
- UAS-Dchs2CT– Contiene el péptido señal, el dominio de transmembrana y la región citoplasmática de la proteína Dchs2 de ratón.



### 1.3 Análisis de sobreexpresión mediante el sistema Gal4/UAS

El sistema Gal4/UAS de levaduras es un método utilizado en *Drosophila melanogaster* para la sobreexpresión de variantes genéticas (Brand y cols., 1994). El sistema GAL4/UAS consiste en la combinación de dos líneas transgénicas independientes que contienen los siguientes elementos: La proteína Gal4, un activador transcripcional y la secuencia UAS (*Upstream Activation Sequences*), una secuencia a la que se une específicamente la proteína Gal4. La secuencia UAS situada en la región promotora es, esencial para la activación transcripcional de los genes que son regulados por la proteína Gal4.

Dependiendo de los elementos reguladores (*enhancer*) situados próximos al punto de inserción del elemento Gal4, cada línea se expresa de acuerdo a un patrón espaciotemporal específico de tejido a lo largo del desarrollo. La línea UAS, contiene el transgén motivo de estudio bajo el control de las secuencias UAS (ARNi, ADNc, formas mutadas, genes reporteros, etc.). Una de las ventajas de este sistema es que, las líneas transgénicas UAS y Gal4 presentan una viabilidad y unas características similares a las de las moscas silvestres, lo que hace que su mantenimiento sea más sencillo. Cuando ambas líneas se cruzan, la descendencia presenta un fenotipo causado por la combinación de líneas Gal4/UAS parentales.

### 1.4 Análisis clonal

Para generar clones homocigóticos de  $a^{k11011}$  se utiliza la técnica FLP/FRT indujeron que permite inducir recombinación mitótica dirigida (Xu and Rubin, 1993). Esta técnica se basa en la expresión, mediante un promotor inducible por choque térmico (promotor hs), de la enzima Flipasa (Flp) que actúa sobre las secuencias diana FRT provocando una recombinación de las mismas. Larvas de genotipo hsFLP122; FRT42D  $a^{k11011}$ /FRT42D GFP fueron sometidas a un choque térmico de 1 hora a 37°C a las 72±12h después de la puesta. Las clones células mutantes se marcan por la ausencia de GFP.

### 1.5 Inmunohistoquímica de los discos imaginales

Las larvas de estadio III se disecan en PBS y se tratan de acuerdo con el protocolo descrito en Gómez-Skarmeta, 1995. Se fijan en una solución de paraformaldehído 4 %, tres lavados de 15 minutos en PBT (PBS+Tritón X-100 al 3 %) y una hora en PBT-ASB (PBS+Tritón X-100 1 % + Albúmina de suero bovina [ASB] 1 %). Se incuban con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C con agitación. Después de tres lavados consecutivos de 15 minutos en PBT se incuban 2 horas con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente. Después de otros 3 lavados en PBT se procede al montaje utilizando los siguientes medios de montaje: Citifluor (Vector Laboratories) o Vectashield con DAPI

(Vector Laboratories). Los anticuerpos secundarios fluorescentes son de Jackson ImmunoResearch.

Los anticuerpos primarios utilizados son: Anti- $\beta$ galactosidasa (Promega); anti-CD2 (Abd Serotec); anti-Cut (Developmental Studies Hybridoma Bank, Univ of Iowa (DSHB)); anti-digoxigenina (Roche); anti-Dlp (DSHB); anti-Dscyt (generado en este trabajo); anti-Dsex (Strutt y Strutt, 2002); anti-En (DSHB); Anti-GFP (Roche); anti-Sal; anti-V5 (Roche)

### 1.6 Adquisición y tratamiento de imágenes

Para las imágenes fluorescentes de los discos imaginales se ha utilizado un microscopio de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager M2 (Zeiss).

Las imágenes en campo claro de las alas, de las diferentes regiones de cutícula del insecto adulto y de los discos imaginales fueron tomadas con un microscopio Zeiss AxioPlan2 imaging HBO 100 acoplado a la cámara digital SPOT 2slider (Diagnostic Instrument Inc). Para el procesamiento de las imágenes se utilizaron los programas: ImageJ (FIJI) y Adobe Photoshop CS3

### 1.7 Disección de los órganos de ratón en diferentes estadios del desarrollo

La cepa C57Bl/6 de ratón (*Mus musculus*) fue utilizada para diseccionar las cócleas y ojos en dos estadios diferentes: E18.5 (embrionario) y P3 (postnatal).

Para la extracción de los ojos y las cócleas de embriones E18 (día E18.5), se realiza una cesárea a la madre 18 días después de aparecer el tapón vaginal. El proceso de extracción de la cóclea se llevó a cabo siguiendo las directrices del siguiente vídeo: <http://www.jove.com/video/1685/primary-culture-plasmid-electroporation-murine-organ>. Los tejidos se introdujeron en tubos eppendorf, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C.

Para el estadio P3 (Postnatal día 3): El proceso de extracción y conservación de los órganos fue similar al descrito para E18.5.

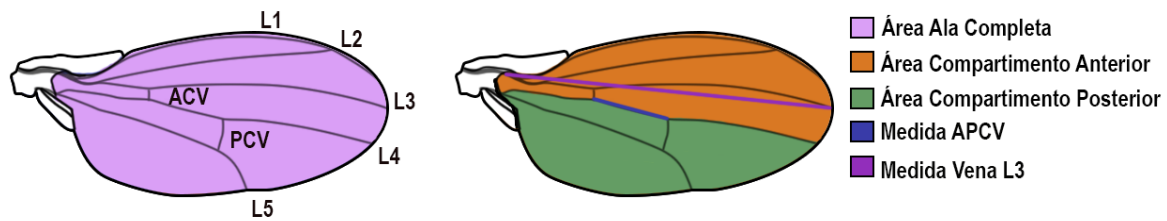
### 1.8 Montaje y medición de alas

Para el montaje de las alas, las moscas de diferentes genotipos son seleccionadas y conservadas en etanol durante 24 horas. Posteriormente las alas se cortan con pinzas y se lavan en etanol (3-4 lavados). El medio de montaje utilizado está compuesto por ácido láctico:etanol (5:6)

Las medidas de las alas se hacen utilizando el programa PhotoShop CS3 a partir de las imágenes tomadas con un objetivo 5X Las diferentes áreas medidas son (Figura MM1):

Área1: Área total del ala

Área2: Compartimento posterior, superficie comprendida entre la vena L4 y el borde posterior



**Figura MM1:** Esquema indicando las venas del ala de *Drosophila* y las distancias y áreas empleadas en las mediciones.

del ala.

Medida APCV: Distancia entre vena perpendicular anterior o *anterior crossvein* (ACV) y vena perpendicular posterior o *posterior crossvein* (PCV) sobre la vena L4

$$R_1 = \frac{L4(ACV - PCV)}{L3} \quad R_2 = \frac{\text{Área}_{C.post}}{\text{Área}_{Total}}$$

Medida vena L3: Longitud de la vena L3 completa.

Para el análisis de la función de Ds sobre la PPC y sobre la proliferación se emplearon dos ratios,  $R_1$  y  $R_2$  respectivamente.

Análisis estadístico: La desviación estándar (DS) y el error estándar de la media (SEM) se calcularon para cada grupo de alas ( $n > 5$ ) empleando el programa GraphPad Prism considerando un P-value menor a 0,05 como significativo. Para estos cálculos se empleó un *Student-t-test (two-tailed)* no paramétrico.

## 2. Biología Molecular, celular y Bioquímica

Los protocolos generales de biología molecular y bioquímica se realizaron siguiendo las directrices del manual (Sambrook y cols., 1989). A continuación se describen aquellos que se han sido utilizados frecuentemente en este trabajo y no están descritos en dicho manual.

### 2.1 Extracción de ARN a partir de tejidos

La extracción de ARN total de los tejidos de *Drosophila melanogaster* y ratón se hizo con el reactivo TriPure (Roche) siguiendo el protocolo de la casa comercial. Previamente los tejidos se habían descongelado en hielo. Tras la extracción, las muestras de ARN se precipitaron con sales y etanol, se resuspendieron en agua milliQ con DEPC (dietilpirocarbonato 0,1%) y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Las muestras de ARN se analizaron individualmente para determinar la concentración (Nanodrop

ND-1100) y la calidad (Bioanalizador Agilent 2100). Las muestras de ARN procedentes de tejidos de ratón se utilizaron sólo si el valor del RIN (RNA Integrity Number) era como mínimo 7.6 sobre 10. Para *Drosophila melanogaster*, el software empleado no permitía conocer el valor del RIN y la calidad del ARN se determinó a partir de la gráfica analizando los dos picos de ARN ribósomico

### 2.2 Análisis mediante PCR de retrotranscripción (RT-PCR)

Para la obtención del ADNc utilizado como molde, se parte de ARN total. Para la transcripción inversa del ARN a ADNc se empleó el kit de Roche “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis”. En cada reacción se emplean 2 µg de ARN de *Drosophila melanogaster* y 5 µg de ARN de ratón. El protocolo seguido es el recomendado por la casa comercial (Roche). Este kit permite amplificar fragmentos largos de ADNc de hasta 14 Kb, y el ADNc de *dachsous* publicado es de 12Kb aproximadamente.

Para realizar las PCR de amplificación se usó la polimerasa Expand High Fidelity PCR System (Roche). Tras la PCR se clonaron los fragmentos con el kit TA Cloning® (with pCR® II Vector) y se realizaron los análisis por secuenciación (ver apartado 2.8) (Tabla Anexo MM1).

### 2.3 Síntesis de sondas de ARN marcadas con digoxigenina

Para preparar las ribosondas de *ds*, se emplearon dos fragmentos distintos de ADNc; para la sonda (EXC) se utilizó un fragmento de 5,2 kb (clon 119 en Clarck, 1995) que comprende los exones del 2 al 11. Para la otra sonda que recibe el nombre de (TM-CT) se utilizó un fragmento de 1,4 kb correspondiente a la mitad 3' del exón 12 que comprende las secuencias del dominio de transmembrana y la región citoplasmática. Las sondas de ARN se generaron siguiendo el protocolo del Kit DIG Northern Starter (Roche).

Para las ribosondas de *dchs1* (*dsch1* OTTMUST00000035612) se utilizaron como moldes la región del ADNc entre las bases 7109-8082 (extracelular) y la 9215-10303 (citoplasmática) respectivamente.

Para el diseño de las ribosondas de *dchs2* (AC107700.12) se parte de la secuencia de ADN genómico que contiene los exones descritos en el ADNc. Al inicio de esta tesis la secuencia de ADNc disponible en NCBI no parecía susceptible de traducirse por la presencia de un codón de terminación. Sin embargo por RT-PCR, en este trabajo, se ha podido caracterizar un ADNc con una composición exónica diferente al publicado y con una fase de lectura abierta comprobada por secuenciación. La ribosonda extracelular comprende los nucleótidos 12500-33200 y la citoplasmática los nucleótidos 119221-120338.

## 2.4 Análisis por la técnica de northern blot

Para este tipo de análisis se cargaron 20 µg de ARN total por pocillo en el caso de *Drosophila*. La electroforesis se hizo en un gel de agarosa con formaldehído al 1 % empleando el amortiguador (*buffer*) MOPS1X. Para la transferencia se utilizó una membrana de nylon cargada positivamente (Roche) y *buffer* SSC20X.

El protocolo de hibridación seguido fue el descrito en el kit DIG Northern Starter (Roche), con las siguientes modificaciones:

- Se utiliza el *buffer* Church modificado para la prehibridación y la hibridación (Church y Gilbert, 1984)
- La temperatura de incubación para la prehibridación y la hibridación fue 65°C en lugar de 68°C.

## 2.5 Clonajes para la generación de líneas transgénicas de *Drosophila*

Para la clonación de los distintos ADNcs utilizados como insertos se amplificaron por PCR (Pwo master [Roche] o Platinum Pfx DNA Polymerase [Invitrogen]) y se analizaron por secuenciación. Las distintas formas de Ds en pUAS<sup>t</sup> se obtuvieron según se describe a continuación:

- Para generar las líneas Ds en las que se eliminan dominios de la región citoplasmática (DsICΔ) y las líneas Dchs1CT y Dchs2CT en las que se inserta un péptido señal previo a la secuencia del dominio transmembrana, se ha empleado la técnica de SOEing PCR (ver apartado 2.6). Los insertos obtenidos por esta técnica se clonan en el vector pUAS<sup>t</sup> (con EcoRI).
- Para la línea DsIntra-V5-6His se amplifica la región citoplasmática de Ds añadiendo a los extremos EcoRI y XbaI (Tabla Anexo MM2). Una vez digerido se clona en el vector pAC5.1, que permite incorporar en la región 3' las secuencias de V5 y 6His. Empleando este nuevo plásmido como molde, se obtiene con las enzimas un fragmento que incorpora en los extremos EcoRI y XhoI y se clona en el vector pUAS<sup>t</sup>.
- Para DsExGFP se realizaron dos PCRs paralelas para amplificar la región extracelular de Ds desde el exn 1 al 10 y por otra parte la secuencia de la proteína GFP (Tabla Anexo MM3). Una vez purificados ambos fragmentos se clonaron por separado en el vector pUAS<sup>t</sup> el inserto y la secuencia de la proteína de fusión GFP usando las enzimas KpnI y NotI.

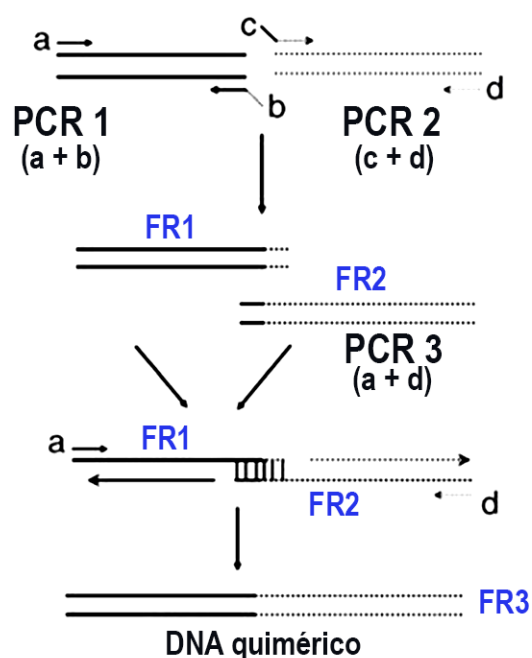
En todos los casos, para la digestión de los insertos se empleó un *buffer* universal compatible



con todas las enzimas de restricción y que permite digestiones dobles sin necesidad de hacerlas de forma secuencial. Su composición es: Tris Acetato 33mM a pH 7.5; acetato de Magnesio 10mM; acetato de Potasio 66mM; fracción V de ASB 0.1 mg/ml, DTT 0.1mM y espermidina 0.3 mM.

### 2.6 Mutagénesis mediante el método SOEing-PCR

La técnica SOEing-PCR (Splicing by Overlap Extension PCR) permite hacer cambios (eliminar o añadir nucleótidos) en la secuencia mediante tres rondas consecutivas de PCR (figura MM2) (Heckman y pease, 2007; Warrens y cols., 1997). La base de esta técnica es el diseño de los oligonucleótidos. Para las dos primeras rondas de PCR (generación de fragmentos FR1 y FR2) se



**Figura MM2.** Esquema mostrando los 3 pasos utilizados en la técnica SOE-ing PCR (modificada de Heckman y cols., 2007)

necesitan dos cebadores denominados *master* de aproximadamente 15 nucleótidos, que son los que flanquean la secuencia completa, y dos cebadores denominados "solapantes" de mayor tamaño (aproximadamente 30 nucleótidos), situados en los extremos de la secuencia que se quiere modificar (deleción o inserción). La amplificación del fragmento FR1 se lleva a cabo con la combinación de cebadores: *master* a y solapante b. La secuencia del cebador solapante b debe contener además de la secuencia del inserto (FR1) aproximadamente 15pb solapantes con el otro inserto (FR2). Para obtener el fragmento FR2 se utilizan los cebadores: el *master* d y solapante c. Por último, la tercera ronda de PCR utiliza como molde una mezcla de los fragmentos FR1 y FR2 y los cebadores *master* a y b. Tras la desnaturalización del ADN molde, los fragmentos FR1 y FR2 hibridan por su región solapante y los

cebadores *master* permiten la amplificación de un ADN quimérico (FR3) que pierde la secuencia que se encontraba entre FR1 y FR2 en el ADN molde original. Aunque en esta última ronda el producto de la PCR deseado es el más abundante, se generan también varios productos inespecíficos, por lo que es importante la purificación de los insertos mediante electroforesis en gel de agarosa.

En las sucesivas PCRs se ha empleado el kit Expand High fidelity PCR system (Roche) (Tabla

Anexo MM4).

El fragmento FR3 se clona en el vector pGEMT-easy (clonación mediante cola de poliA/T) y se analiza mediante secuenciación para comprobar que no hay mutaciones.

## 2.7 Obtención de ADN a partir de cultivos bacterianos

En todos los casos se utiliza el medio 2XYT (1L: 16gr de Bacto triptona; 5gr de ClNa; 10gr de extracto de levadura) añadiendo el antibiótico correspondiente.

La extracción de ADN plasmídico se hace mediante el método “*Boiling Method*” (sólo válido para cepas *E.coli* DH5a y XL1-Blue): 1.5 ml de medio de cultivo se centrifuga a 12000 rpm en un tubo eppendorf, durante 1 minuto. El *pellet* se resuspende en 250 µl de solución STETL fresca (Sacarosa al 5 %, Tritón X-100 al 10%, Tris 50 mM a pH 8.0, EDTA 50mM) + 0.5 mg Lisozima por 1 ml de medio).

La mezcla se hierve a 100°C durante 60 segundos, se homogeneiza por inversión y se centrifuga a 12000 rpm durante 10 minutos, a temperatura ambiente. El *pellet* viscoso se retira con un palillo estéril y a la fase líquida se le añade 0.6 volúmenes de isopropanol, y se deja 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, el *pellet* de ADN se resuspende en 30 µl de una solución fresca de agua milliQ estéril con 0.15 µl de ARNs (10 mg/µl).

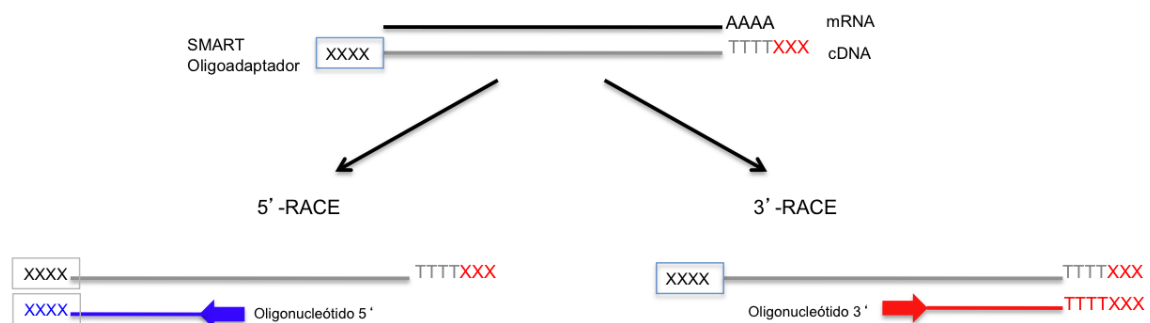
Para la obtención de cantidades mayores de ADN se empleó el kit Qiagen Plasmid Midi (Qiagen).

## 2.8 Secuenciación de los fragmentos de ADN

El ADN obtenido por amplificación mediante PCR en los diferentes apartados de esta tesis se analizó por secuenciación en los servicios de Genómica del IIB o del Parque Científico de Madrid para comprobar que las secuencias eran correctas.

## 2.9 Determinación de los extremos 5' y 3' del ADNc mediante la técnica RACE

Los experimentos de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) se realizaron con el Kit SMATer



**Figura MM3:** Esquema de la técnica RACE empleada para determinar los extremos 5' y 3' de un ADNc

RACE cDNA Amplification (Clontech) (Figura MM3). El ADNc molde procede de varias genotecas generadas de forma independiente a partir de dos muestras distintas de ARN total, extraído de tejidos de *Drosophila* y ratón (ver apartado 2.1). Para determinar los extremos 5' y 3' de cada isoforma, la amplificación por PCR de los fragmentos de ADN se hizo con la polimerasa del kit con Advantage 2 PCR Kit (Clontech), utilizando los cebadores aportados por el kit (genéricos de regiones 5' y 3') y los específicos de cada exón diseñados de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el kit (Tabla Anexo MM5). Los productos del RACE fueron clonados en el vector TA Cloning® Kit Dual Promoter-pCR®II (Invitrogen). Para determinar las secuencias de los extremos de cada producto RACE, se secuenciaron al menos 3 clones diferentes (excepto en los casos indicados en el apartado resultados).

### 2.10 Análisis por PCR cuantitativa (RT-qPCR)

Para llevar a cabo los experimentos de RT-qPCR (Real Time quantitative PCR) partimos de tres muestras biológicas independientes de ARN total para cada uno de los genotipos analizados: silvestre (*yw*), *tubG4/UAS-dsRNAicyt*, *tubG4/UAS-dsRNAiex*, *ds<sup>36D</sup>/ds<sup>36D</sup>*, *ds<sup>38K</sup>/ds<sup>38K</sup>*. El ARN se extrajo de cerebros y discos imaginales de larvas de tercer estadio excepto para *ds<sup>36D</sup>* para el que fueron embriones. La RT-qPCR se realizó en dos pasos sucesivos: generación del ADNc molde (ver apartado 2.2) y amplificación de los exones individuales.

El ADNc utilizado se obtuvo utilizando sólo el oligodT. Las diferentes parejas de oligonucleótidos fueron diseñadas con el software Universal Probe Library Assay Design Center (Roche) para cumplir con los criterios de optimización (Tabla Anexo MM6). Para normalizar los valores obtenidos en los diferentes ensayos de RT-qPCR a partir de tres muestras de ADNcs diferentes, se utilizaron los siguientes genes como control fueron: *Tbp* (*TATA binding protein*), *RpL32* (*Ribosomal protein L32*), y *eIF-2a* (*Eukaryotic Initiation Factor 2 a subunit*).

Las reacciones de RT-qPCRs se realizaron en un volumen de 50 µl con los componentes correspondientes. (Tabla Anexo MM7).

Los experimentos se llevaron a cabo en una placa de 384 pocillos en el termociclador ABI 7900HT SD (Applied BioSystem) del servicio de genómica del CBMSO. Para la cuantificación absoluta de las muestras silvestres, se utilizaron como patrón interno 5 diluciones seriadas 1:10 en *buffer* TE del plásmido *pUAS-ds* que contiene desde el exn 2 al 12 (Matakatsu, 2004). La eficiencia de la amplificación de los pares de cebadores elegidos para cada exón se calculó mediante el programa SDS2.0 del ABI Prism (Wong y Medrano, 2005). La cuantificación absoluta se realizó a partir de los resultados aportados por el programa SDS2.0 del ABI Prism y analizados con el programa Excel (Microsoft). La cuantificación relativa (método Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )) de los diferentes fondos genéticos

mencionados anteriormente se llevó a cabo con los datos aportados por el SDS2.0 del ABI Prism y analizados por el programa GenEx Professional 4.4.2 (MultiD, Suecia) en las condiciones especificadas en Wong y Medrano, 2005.

Análisis estadístico: La desviación estándar (DS) y el error estándar de la media (SEM) se calcularon para cada exón y cada muestra biológica empleando el programa GraphPad Prism considerando un *P-value* menor a 0,05 como significativo. Para estos cálculos se empleó un *Student-t-test* (*one-tailed*) no paramétrico.

### 2.11 Extracción de proteínas

Para los experimentos de western blot se utilizaron extractos de proteínas de cultivos celulares S2 y de cerebros y discos imaginales de larvas de estadio III.

Las células S2 se recogieron de la placa y se lavaron con PBS a 4°C. Una vez eliminado el medio se añadieron 100ml de *buffer* de lisis (Tris 50mM a pH7.5; NaCl 150mM; Tritón 1 %; EDTA 2mM). Para los experimentos de fosforilación de la región citoplasmática de Ds, cada muestra se separó en dos tubos *eppendorff* para su tratamiento posterior con fosfatasas. Ambos se incubaron 45 minutos en la cámara de 4°C con agitación (noria).

La disección de tejidos se llevó a cabo en solución Ringer fría con una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete-mini, Roche). Para cada muestra se disecaron de 20 a 30 cabezas (cerebro + discos imaginales) que se introdujeron en hielo seco para que la congelación sea rápida y se guardan a -80°C. Para extraer las proteínas de cada muestra se le añadieron 100 µl *buffer* de lisis con proteasas (Complete-brai [Roche]) y se homogeneizó manualmente con un pistilo de *eppendorff*. Se centrifugó 15 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante. La concentración de proteínas totales para cada muestra se calculó por el método de BCA (Pierce® BCA Protein Assay Kit) y se prepararon alícuotas de 30mgr de proteína total que se conservaron a -20°C.

Las fosfatasas empleadas fueron: CIP (Calf Intestine Phosphatase [New England Byolabs]) y TSAP (Termosensitive Alkaline Phosphatase [Invitrogen]. Su uso se llevó a cabo siguiendo el protocolo de las casas comerciales.

### 2.12 Análisis por la técnica de western blot

El análisis de proteínas mediante western blot se realiza según el protocolo descrito en (Sambrook y cols., 1989).

Como la proteína Dachsous se encuentra a baja concentración en los extractos totales de tejidos, los mejores resultados se obtienen con transferencia húmeda durante toda la noche a 4°C (25 Voltios)

y con membranas *Immun-Blot® PVDF* (BioRad). Para los extractos procedentes de transfecciones en células S2, la transferencia se realiza con el *Trans-Blot Turbo Blotting System* (BioRad) con el programa Standard SD y membranas de nitrocelulosa (0,45 mm, BioRad).

Las soluciones utilizadas para el bloqueo y la incubación con anticuerpos se contienen leche al 0,5 % para las membranas de PVDF y ASB al 5 % para las de nitrocelulosa.

Los anticuerpos primarios utilizados son anti-Dachsous cyt (1:2000, , anti-Dachsous ec (1:2000), anti V5 (1:5000) y anti-GFP (1:1000). Los anticuerpos secundarios que se han utilizado dependen del método de detección empleado: anticuerpos conjugados a HRP (*Horseradish Peroxidase*, Amersham Bioscience) para revelar con ECL (GE Healthcare ) o con Luminata™ Crescendo (Millipore) y anticuerpos IRDye (LI-COR Bioscience) para revelar con el sistema *Odyssey Imaging System* (LI-COR Bioscience).

### 2.13 Cultivos celulares

La línea celular Schneider 2 de *Drosophila* (S2) que proceden de tejido embrionario se crecieron en incubadores a 25°C y medio X-Press (Gibco) enriquecido con suero fetal de ternera (SFT) al 7 %.

Para las transfecciones se emplearon células S2

Para cada transfección se emplearon  $2 \times 10^6$  células S2 (contadas en cámara de Neubauer) crecidas en placas p100 con una confluencia del 80 %, 2µg de ADN plasmídico y el sistema de electroporación *Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V* (Lonza). Las células electroporadas se incubaron 48 horas en placas multipocillo p12 a 25°C.

Los insertos se obtuvieron a partir de las correspondientes construcciones de pUASt mediante PCR.

Cada fragmento purificado por el método fenol se clonó en fase con el epítipo GFP utilizando los sitios de restricción EcoRI-XbaI del vector Stable2.

Los plásmidos empleados en las transfecciones fueron:

Stable2-DsCT; Stable2-DsΔ1; Stable2-DsΔ2; Stable2-DsΔ3; Stable2-DsΔ4; Stable2-DsΔ5.

Cada uno de los insertos está descrito en el apartado 1.2.

### 2.14 Inmunoprecipitación

Para los ensayos de inmunoprecipitación partimos de extractos de proteínas de células S2 transfectadas con los ADN plasmídicos correspondientes a cada experimento. Todos los pasos a partir de la lisis de las células se realizaron a 4°C para evitar la degradación de las proteínas. El lisado se incubó con 30µl de proteína G Sepharosa™ 4 Fast Flow (HE Healthcare) durante 1 hora con agitación



para eliminar fondo. Posteriormente se centrifugó a 8000rpm durante 2 minutos y el sobrenadante se incubó toda la noche con el anticuerpo primario (antiGFP 1:50).

A continuación se añadieron 50µl de proteína G Sepharosa™ 4 Fast Flow (HE Healthcare) y se incubó 2 horas en agitación. Tras tres lavados con 1ml de buffer de lisis (8000rpm durante 1 minuto se añaden 20µl de buffer de carga. Todas las muestras se hirvieron 10 minutos y el sobrenadante (8000rpm 1 minuto) se cargó en un gel de poliacrilamida-SDS siguiendo el protocolo de western blot.

## 2.15 Generación del anticuerpo policlonal de Dachsous

Para generar un anticuerpo que reconociera la región citoplasmática de la proteína Dachsous se utilizó, el programa Antheprot para seleccionar las regiones antigénicas (Figura MM4).



**Figura MM4:** Esquema de la región citoplasmática de Ds indicando la secuencia utilizada para la generación del anticuerpo. Secuencia de aminoácidos de Ds donde se destaca la región transmembrana (azul), los péptidos más antigénicos (rojo) y el péptido inoculado (verde)

La secuencia que contiene la región citoplasmática elegida se amplificó por PCR y se clonó con las enzimas EcoRI y XhoI en el vector pGEX4T2 (Tabla Anexo MM8), un vector de expresión para bacterias que genera una proteína de fusión Ds-GST. El vector se transformó por electroporación en la cepa *E. Coli Rosetta gami 2* (DE3) y se cultivó en un fermentador para obtener grandes cantidades de proteína (Servicio de fermentación del CBM).

La inducción de la proteína con IPTG 1mM se llevó a cabo en un cultivo de 250ml de *E. Coli Rosetta gami 2* crecido hasta una densidad óptica de 0,6 . Tras 2,5 horas de inducción, las bacterias se sedimentaron por centrifugación (5000rpm 15 minutos) y se resuspendieron en 50 ml buffer de lisis (lisozima 0,2mg/ml; EDTA 0,2mM; PBS 1X; Inhibidores de proteasas 1X (Complete-mini, [Roche])). se incubaron 20 minutos en hielo y se añadieron DTT al buffer de lisis (hasta 5mM de concentración final). Tras 10 minutos en hielo se sonicaron las bacterias para asegurar la lisis de las mismas. Para separar la fracción soluble de la insoluble, se centrifugó a (8000g 15 minutos) y se analizaron las muestras

recogidas en los diferentes pasos mediante electroforesis en gel de acrilamida (PAGE).

Purificación: La proteína de fusión Ds-GST se pasa por una columna de Glutathione Sepharose™ 4B y se eluye con *buffer* glutathion (Glutathion 10mM; Tris 50mM a pH8) . Para calcular la concentración por densitometría, se analizaron las muestras de cada una de las fracciones recogidas durante la elución, se corrieron en un PAGE utilizando como patrón diferentes concentraciones de ASB.

Inoculación de dos cobayas: La primera inoculación fue intradérmica (450µgr de proteína ;y adyuvante de Freund Completo). Cada 2 semanas se hicieron dos inoculaciones más (600µgr de proteína y adyuvante Freund incompleto). Tras la tercera inoculación se valoró el título del anticuerpo y se recogió el sangrado de ambos animales. Después de incubar la sangre 3 horas a 37°C, y toda la noche a 4°C. se centrifuga a 2500rpm (para evitar que se lisasen los hematíes) durante 15 minutos. El suero resultante conteniendo el anticuerpo se repartió en alícuotas que se guardaron a -80°C.







## ANEXO

CAGAAGACTG





- Tabla Anexo MM1

Nombre	Secuencia de los cebadores
Dchs2 exón 2 dir	ggaactgagatcatcaacgctc
Dchs2 exón 11 rev	gtggtctgcatgatgtggatg
Dchs2 exón 12 rev4	ggaaggctggggagtgg
Dchs2 exón 12 rev2:	ggatgccagaggaaattcg
Dchs2 exón 12 rev3:	gctgccgagctgtgc c
Dchs2 exón 12 rev3:	ccactccccagccttcc
Dchs2 exón 12 dir2:	gctctcctatttcctttgacc
Dchs2 exón 12 dir:	cgaatttcctctggcgatcc
Dchs2 exón 15 dir:	gggcatcatcaaataactgtcc
Dchs2 exón 15 rev:	ccgggagacactgaggg
Dchs2 exón 17 rev:	ccccatggctactggcg
Dchs2 exón 18 dir2:	gcagagatgaatggagaagtagc
Dchs2 exón 18 rev3:	ggaacaaatctcctgtcgagc
Dchs2 exón 18 dir3:	cccacctttgtgtcctatcc
Dchs2 exón 18 rev:	gctactctccattcatctctgc
Dchs2 exón 18 dir:	cccggaaaacacgaagcc
Dchs2 exón 18 rev2:	ggcttcgtgtttccggg
Dchs2 exón 22 dir2:	gccgctatctctacacagg
Dchs2 exón 22 Rev:	cctgtgtagagatagcggc
Dchs2 exón 22 dir:	cgctgttgacggggagc
Dchs2 exón 22 rev2:	gctcccggtccaaagcacg
Dchs2 exón 22 dir3:	cctatctggtgcagttattgg
Dchs2 exón 21 dir:	gcgagatggcgggtgcc
Dchs2 exón 21 rev:	ggacaccgccatctcgc
Dchs2 exón 24 dir:	gcaactcatcgtagaagagc
Dchs2 exón 24 rev:	gctctctacgatgagttgc
Dchs2 exón 26 dir:	gcaagccacagacagagg
Dchs2 exón 26 rev:	cctctgtctgtggcttgc
Dchs2 exón 29 rev4:	gcaacacaagagcacccc
Dchs2 exón 29 dir4:	ccattgatccttgacagggg
Dchs2 exón 29 rev:	gccaagcatgtgcgttcc
Dchs2 exón 29 dir2:	ccaaacccggctccaaatcc
Dchs2 exón 29 rev2:	ggatttgagccgggttgg
Dchs2 exón 29 dir:	ccccgagttccagcagg
Dchs2 exón 29 rev3:	cctgctggaaactcgggg

**Tabla Anexo MM1:** Cebadores utilizados para la clonación y secuenciación de los distintos fragmentos de ADNc de Dchs2.

- Tabla Anexo MM2

Nombre	Secuencias de los cebadores
RI- DsCyt(-tmb)	gcagcagaattcatgcatatgagaagccgaaaacc
6His-x hol rev	agagatctcgagatggtgatggtgatgatgacc
DsIC-XbaI	gcagcatctagacatccgtgtcccccacatt
<b>Tabla Anexo MM2:</b> Cebadores utilizados para la clonación de DsIntra-V5-6His.	

- Tabla Anexo MM3

Nombre	Secuencias de los cebadores
Not-DsExc	gcagcagcgggccgcatgctgcgaagtagcttac
DsExc10-Kpn	gcaggtacctcccacagtgggtgattaatc
Kpn-GFP	gcaggtaccatggtgagcaagggcgag
GFP-Kpn	gcaggtaccctgtacagctcgtccatg
<b>Tabla Anexo MM3:</b> Cebadores utilizados para el clonaje de DsExGFP.	

- Tabla Anexo MM4

Nombre	Secuencia de los cebadores
Oligo SOE1 D-Dachsous $\Delta 1$ dir:	atgctgcaagtagcttac
Oligo SOE1 D-Dachsous $\Delta 1$ rev:	cgatatgcttcctctgatgaatagaaagattccg
Oligo SOE2 D-Dachsous $\Delta 1$ dir:	atctttctattcatcagaggaagcatatcgggc
Oligo SOE2 D-Dachsous $\Delta 1$ rev	ttacatccgtgtccccacat
Oligo SOE1 D-Dachsous $\Delta 2$ rev	attgcggtgatgcagttcggagcccgacaactcg
Oligo SOE2 D-Dachsous $\Delta 2$ dir	gtgtcgggctccgaactgcatcaccgcaatggtg
Oligo SOE1 D-Dachsous $\Delta 3$ rev:	tccactgtgctccgaaccaccacattactgcc
Oligo SOE2 D-Dachsous $\Delta 3$ dir	agtaatgtgggtggttcggagcacagtgggaagtgg
Oligo SOE1 D-Dachsous $\Delta 4$ rev	gtgcgtgggtggtccgggggcccagggtcaaatg
Oligo SOE2 D-Dachsous $\Delta 4$ dir:	agcctggccccggaccaccacgcacctg
Oligo SOE1 D-Dachsous $\Delta 5$ rev	ggttaatggcccttggtggtgctgagggtggtg
Oligo SOE2 D-Dachsous $\Delta 5$ dir	ccaccctcagcaccaccaagggccattaacctgc
<b>Tabla Anexo MM4:</b> Cebadores utilizados para la clonación de las distintas formas truncadas de la región citoplasmática de Ds.	

- Tabla Anexo MM5

Nombre	Secuencia de los cebadores RACE
RACE 5' exón2	ccagtggcccgatctatggcgagatg
RACE 5' exón 12	ctgctaaccaatgtggcaccaagggcc
RACE 3' Exón2	ggaggaacacccccgttcggtgctggtgatt
RACE 3' exón 10	ggagagctaagtgcggacccttg
RACE 3' exón 12	gctcctccgaagtacgacgacgagattcct
<b>Tabla Anexo MM5:</b> Cebadores utilizados para realizar de la técnica RACE.	

Muestra	r <sup>2</sup>	Y-intercept	Slope	Eficiencia (*)	Longitud del amplicón del ADNc	Cebador Dir	Cebador Rev	Intron-spanning (a)
Exón 2	>0.99	11,96	-3,32	0,998	74pb	ccaggataacacagtatttattggt	tcggtgctacaacactcag	no
Exón 3	>0.99	12,71	-4,15	0,740	60 bp	cttcgagtactcggattgtcg	ggccaaagtctcgtatcc	no
Exón 4	>0.99	12,38	-3,46	0,942	72 bp	tcccaacgacacacccctaatt	gatggttaagtctgcgaaagg	no
Exón 5	>0.99	10,19	-3,33	0,995	67 bp	cgcaaaaacacggttcattagtt	agattctggaaactgggatca	no
Exón 6	>0.99	14,54	-4,50	0,666	67 bp	atctatcgctgggtgtgg	gcaacatccgtaccgtctc	no
Exón 7	>0.98	10,81	-3,54	0,914	60 bp	cttgaccaaggaccgatcg	accaggttcccgaatgc	no
Exón 8	>0.98	10,30	-3,30	1,007	66 bp	ggtgcaaaaagatcatggicaa	tgaacgataaggtcagatttaga	no
Exón 9	>0.99	11,37	-3,36	0,981	60 bp	ccttcagcggtgagaaagc	tggccattcgatgatctcc	no
Exón 10	>0.99	12,19	-3,56	0,906	80 bp	cgagattcaagctgagcaaa	cgcactgatctgcaccac	no
Exón 11	>0.99	10,25	-3,37	0,978	75 bp	tgaatacgtgtgttcttagtgc	tcaatcactagttccgatagc	no
Exón 12A	>0.99	10,60	-3,21	1,048	60 bp	cggtagtccatagcgcagtt	tgagttggggtgttttct	no
Exón 12B(S)	>0.99	10,90	-3,18	1,058	157 bp	gtggttccttgagctccata	ccactgtctccgataaagggtg	no
Exón12B(L)	>0.99	14,08	-3,75	0,847	1313pb	tccatatgag aagcagaaaa ccgc	aatgt ggggacacggatg	no
TAA binding protein (Tbp)	>0.99	24,00	-4,43	0,680	124/423bp	ggcaaaagagtgaggacgact	gagccgaccatgttttgaat	sí
Eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ (eIF-2 $\alpha$ )	>0.99	20,81	-4,57	0,654	114/178bp	tcgcatcaacctgatagcac	atcgtagtctggtgtctgg	sí
(*) Los valores de eficiencia >1 no son posibles, estos resultados son causados por pequeños errores de pipeteo y/o efectos de inhibición en los puntos más concentrados de la curva. (0,1 ng DNA)								
(a) Los oligonucleótidos control fueron diseñados para anillar en diferentes exones. Los productos de amplificación del ADNc y del ADN genómico serían diferentes, lo que nos sirve como control de una posible contaminación de ADN genómico.								
<b>Tabla MM6:</b> Cebadores utilizados para la técnica RT-qPCR y características de las distintas reacciones.								



- Tabla Anexo MM7

Reactivos	Vol. 1 reacción
<i>Buffer</i>	2 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,2 µl
dNTPs	0,4 µl
Cebadores	1,5 µl
Hot Star Taq Polymerase (Qiagen)	0,1 µl
SYBR Green (Qiagen, Crawley, UK)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	11,8 µl
Vol. Total	19 µl
<b>Tabla Anexo MM7:</b> Compuestos empleados en cada una de las RT-qPCRs y sus cantidades por reacción.	

- Tabla Anexo MM8

Nombre	Secuencia de los cebadores
Oligo pGEX4T2- EcoRI ds dir	cgcggaattctcaatagctatgtggacccc
Oligo pGEX4T2-ds XhoI rev	cgcgctcgagtgaggaatgtgaggaagag
<b>Tabla Anexo MM8:</b> Cebadores utilizados para la clonación de la región citoplasmática de Ds empleada para la generación del anticuerpo Dscyt	



## ABREVIATURAS

[illegible]



**A**

<i>a</i>	<i>arc</i>
A	Anterior
ABS	Albúmina de Suero Bovina
ACV	Anterior Crossvein (Vena perpendicular anterior)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
A/P	Anteroposterior
<i>ap</i>	<i>apterous</i>
<i>app</i>	<i>approximated</i>
ARN	Acido Ribonucleico
ARNi	ARN interferente
<i>atonal</i>	<i>ato</i>

**B**

<i>bib</i>	<i>bigbrain</i>
BMP	Bone Morphogenetic Protein (Proteína morfogenéticas ósea)
<i>brinker</i>	<i>brk</i>



## ABREVIATURAS

---

### C

C-Iro	Complejo génico <i>Iroquois</i>
CIP	Calf Intestinal Phosphatase (Fosfatas de intestino de ternera)
<i>ct</i>	<i>cut</i>
CT	Citoplasmático
<i>ci</i>	<i>cubitus interruptus</i>

### D

<i>d</i>	<i>dachs</i>
D	Dorsal
<i>dad</i>	<i>daughter against Dpp</i>
<i>dally</i>	<i>division abnormally delayed</i>
<i>dchs1</i>	<i>dachsous1</i>
<i>dsch2</i>	<i>dachsous2</i>
<i>dco</i>	<i>disc overgrowth</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
<i>dgo</i>	<i>diego</i>
<i>dl</i>	<i>delta</i>
<i>dlp</i>	<i>dally like protein</i>
<i>dpp</i>	<i>decapentaplegic</i>
<i>ds</i>	<i>dachsous</i>
<i>dsh</i>	<i>dishevelled</i>
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank
D/V	Dorso-ventral
<i>dx</i>	<i>deltex</i>

### E

E	Embrionario
EC	Extracelular
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor o factor de crecimiento epidérmico
<i>en</i>	<i>engrailed</i>
E(spl)	Enhancer of Split

### F

<i>ft</i>	<i>fat</i>
-----------	------------

FL	Full lenght (Proteína completa)
<i>fmi</i>	<i>flamingo</i>
<i>fj</i>	<i>Four-jointed</i>
<i>fng</i>	<i>fringe</i>
<i>fz</i>	<i>frizzle</i>
<b>H</b>	
h	horas
<i>hh</i>	<i>hedgehog</i>
<i>hth</i>	<i>homothorax</i>
<i>hpo</i>	<i>hippo</i>
<b>I</b>	
IC	Intracelular
<i>lft</i>	<i>lowfat</i>
<b>M</b>	
<i>mnb</i>	<i>minibrain</i>
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanesulfónico
<b>N</b>	
<i>nkd</i>	<i>naked</i>
NICD	Notch Intracellular Domain (Dominio intracelular de Notch)
<i>nmo</i>	<i>nemo</i>
<i>nompC</i>	<i>non mechanoreceptor potencial C</i>
N	Notch
<i>nub</i>	<i>nubbin</i>
<b>O</b>	
<i>omb</i>	<i>optomotor blind</i>
OJ	Órgano de Johnston
<b>P</b>	
P	Posterior
P3	Posnatal 3
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Phosphate buffer saline
PBT	PBS + Tween
PCR	Polymerase Chain Reaction

## ABREVIATURAS

---

PCV	Posterior crossvein (vena perpendicular posterior)
P/D	Proximo –distal
<i>pk</i>	<i>prickled</i>
PPC	Polaridad Planar Celular
POS	Precusores de órganos sensoriales
<i>ptc</i>	<i>patched</i>

### R

RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RIN	RNA Integrity Number
<i>riq</i>	<i>riquiqui</i>
rpm	Revoluciones Por Minuto
RT-PCR	Retrotranscriptase PCR
RT-qPCR	Real Time Quantitative PCR

### S

S2	Schneider 2
<i>sal</i>	<i>spalt</i>
<i>salr</i>	<i>spalt related</i>
<i>sav</i>	<i>salvador</i>
<i>sens</i>	<i>senseles</i>
<i>ser</i>	<i>serrate</i>
SFT	Suero Fetal de Ternera
SOE-PCR	Splicing by Overlap Extension PCR
<i>stan</i>	<i>starry night</i>
<i>Su(h)</i>	<i>supressor of hairless</i>

### T

TM	Transmembrana
TSAP	Thermosensitive Alkaline Phosphatase o fosfatasa alcalina termosensible
<i>tsh</i>	<i>teashirt</i>

### U

UAS	Upstream Activation Sequence
UTR	Untranslated Region

### V

V	Ventral
---	---------

*vang*                      *van gogh*

*vg*                        *vestigial*

*vn*                        *vein*

## W

*wg*                        *wingless*

*wt*                        *wild type*

*wt*s                      *warts*

## Y

*yki*                      *yorkie*

*yw*                        *yellow white*

## Z

*zfh-2*                    *zinc finger homology-2*

*zyxin*                    *zyx*





[illegible]

## BIBLIOGRAFÍA

[illegible]



- **Adler, P. N.** The frizzled/stan pathway and planar cell polarity in the Drosophila wing. *Curr Top Dev Biol* **101**, 1-31.
- **Adler, P. N.** (2002). Planar signaling and morphogenesis in Drosophila. *Dev Cell* **2**, 525-35.
- **Adler, P. N., Charlton, J. and Liu, J.** (1998). Mutations in the cadherin superfamily member gene dachsous cause a tissue polarity phenotype by altering frizzled signaling. *Development* **125**, 959-68.
- **Ambegaonkar, A. A., Pan, G., Mani, M., Feng, Y. and Irvine, K. D.** (2012). Propagation of Dachsous-Fat Planar Cell Polarity. *Curr Biol*.
- **Ashburner, M. and Gubb, D.** (1989). Chaotic names. *Nature* **339**, 264.
- **Axelrod, J. D.** (2001). Unipolar membrane association of Dishevelled mediates Frizzled planar cell polarity signaling. *Genes Dev* **15**, 1182-7.
- **Baena-López, L. A., Baonza, A. and García-Bellido, A.** (2005). The orientation of cell divisions determines the shape of Drosophila organs. *Curr Biol* **15**, 1640-4.
- **Baena-López, L. A., Pastor-Pareja, J. C. and Resino, J.** (2003). Wg and Egfr signalling antagonise the development of the peripodial epithelium in Drosophila wing discs. *Development* **130**, 6497-506.
- **Baena-López, L. A., Rodríguez, I. and Baonza, A.** (2008). The tumor suppressor genes dachsous and fat modulate different signalling pathways by regulating dally and dally-like. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9645-50.



- **Barolo, S., Walker, R. G., Polyanovsky, A. D., Freschi, G., Keil, T. and Posakony, J. W.** (2000). A notch-independent activity of suppressor of hairless is required for normal mechanoreceptor physiology. *Cell* **103**, 957-69.
- **Bechstedt, S. and Howard, J.** (2008). Hearing mechanics: a fly in your ear. *Curr Biol* **18**, R869-70.
- **Bermingham, N. A., Hassan, B. A., Price, S. D., Vollrath, M. A., Ben-Arie, N., Eatock, R. A., Bellen, H. J., Lysakowski, A. and Zoghbi, H. Y.** (1999). Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* **284**, 1837-41.
- **Blair, S. S.** (2003). Lineage compartments in Drosophila. *Curr Biol* **13**, R548-51.
- **Blair, S. S., Brower, D. L., Thomas, J. B. and Zavortink, M.** (1994). The role of apterous in the control of dorsoventral compartmentalization and PS integrin gene expression in the developing wing of Drosophila. *Development* **120**, 1805-15.
- **Bosveld, F., Bonnet, I., Guirao, B., Tlili, S., Wang, Z., Petitalot, A., Marchand, R., Bardet, P. L., Marcq, P., Graner, F. et al.** Mechanical control of morphogenesis by Fat/Dachsous/Four-jointed planar cell polarity pathway. *Science* **336**, 724-7.
- **Brand, A. H., Manoukian, A. S. and Perrimon, N.** (1994). Ectopic expression in Drosophila. *Methods Cell Biol* **44**, 635-54.
- **Bray, S. J.** (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 678-89.
- **Brennan, K., Tateson, R., Lieber, T., Couso, J. P., Zecchini, V. and Arias, A. M.** (1999). The abruptex mutations of notch disrupt the establishment of proneural clusters in Drosophila. *Dev Biol* **216**, 230-42.
- **Brittle, A. L., Repiso, A., Casal, J., Lawrence, P. A. and Strutt, D.** (2010). Four-jointed modulates growth and planar polarity by reducing the affinity of dachsous for fat. *Curr Biol* **20**, 803-10.
- **Brown, J. B., Boley, N., Eisman, R., May, G. E., Stoiber, M. H., Duff, M. O., Booth, B. W., Wen, J., Park, S., Suzuki, A. M. et al.** Diversity and dynamics of the Drosophila transcriptome. *Nature*.
- **Butler, M. J., Jacobsen, T. L., Cain, D. M., Jarman, M. G., Hubank, M., Whittle, J. R., Phillips, R. and Simcox, A.** (2003). Discovery of genes with highly restricted expression patterns in the Drosophila wing disc using DNA oligonucleotide microarrays. *Development* **130**, 659-70.
- **Capilla, A., Johnson, R., Daniels, M., Benavente, M., Bray, S. J. and Galindo, M. I.** Planar cell polarity controls directional Notch signaling in the Drosophila leg. *Development* **139**, 2584-93.
- **Casal, J., Lawrence, P. A. and Struhl, G.** (2006). Two separate molecular systems, Dachsous/Fat and Starry night/Frizzled, act independently to confer planar cell polarity. *Development* **133**, 4561-72.

- **Chacon-Heszele, M. F. and Chen, P.** (2009). Mouse models for dissecting vertebrate planar cell polarity signaling in the inner ear. *Brain Res* **1277**, 130-40.
- **Chae, J., Kim, M. J., Goo, J. H., Collier, S., Gubb, D., Charlton, J., Adler, P. N. and Park, W. J.** (1999). The Drosophila tissue polarity gene starry night encodes a member of the protocadherin family. *Development* **126**, 5421-9.
- **Chen, Z. Y. and Corey, D. P.** (2002). Understanding inner ear development with gene expression profiling. *J Neurobiol* **53**, 276-85.
- **Cho, E., Feng, Y., Rauskolb, C., Maitra, S., Fehon, R. and Irvine, K. D.** (2006). Delineation of a Fat tumor suppressor pathway. *Nat Genet* **38**, 1142-50.
- **Church, G. M. and Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1991-5.
- **Clark, H. F., Brenttrup, D., Schneitz, K., Bieber, A., Goodman, C. and Noll, M.** (1995). Dachshous encodes a member of the cadherin superfamily that controls imaginal disc morphogenesis in Drosophila. *Genes Dev* **9**, 1530-42.
- **Cohen, B., McGuffin, M. E., Pfeifle, C., Segal, D. and Cohen, S. M.** (1992). apterous, a gene required for imaginal disc development in Drosophila encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Genes Dev* **6**, 715-29.
- **Collu, G. M., Hidalgo-Sastre, A., Acar, A., Bayston, L., Gildea, C., Leverentz, M. K., Mills, C. G., Owens, T. W., Meurette, O., Dorey, K. et al.** Dishevelled limits Notch signalling through inhibition of CSL. *Development* **139**, 4405-15.
- **Cooper, M. T., Tyler, D. M., Furriols, M., Chalkiadaki, A., Delidakis, C. and Bray, S.** (2000). Spatially restricted factors cooperate with notch in the regulation of Enhancer of split genes. *Dev Biol* **221**, 390-403.
- **Couso, J. P., Bate, M. and Martínez-Arias, A.** (1993). A wingless-dependent polar coordinate system in Drosophila imaginal discs. *Science* **259**, 484-9.
- **Couso, J. P. and Martínez Arias, A.** (1994). Notch is required for wingless signaling in the epidermis of Drosophila. *Cell* **79**, 259-72.
- **de Celis, J. F., Barrio, R. and Kafatos, F. C.** (1996a). A gene complex acting downstream of dpp in Drosophila wing morphogenesis. *Nature* **381**, 421-4.
- **de Celis, J. F., García-Bellido, A. and Bray, S. J.** (1996b). Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Development* **122**, 359-69.
- **Dearborn, R., Jr. and Kunes, S.** (2004). An axon scaffold induced by retinal axons directs glia to destinations in the Drosophila optic lobe. *Development* **131**, 2291-303.

- **Degoutin, J. L., Milton, C. C., Yu, E., Tipping, M., Bosveld, F., Yang, L., Bellaiche, Y., Veraksa, A. and Harvey, K. F.** Riquiqui and minibrain are regulators of the hippo pathway downstream of Dachshous. *Nat Cell Biol* **15**, 1176-85.
- **Dekanty, A. and Milan, M.** The interplay between morphogens and tissue growth. *EMBO Rep* **12**, 1003-10.
- **Díaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M.** (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* **75**, 741-52.
- **Díaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M.** (1995). Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 4215-25.
- **Dietrich, U. and Campos-Ortega, J. A.** (1984). The expression of neurogenic loci in imaginal epidermal cells of *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet* **1**, 315-32.
- **Diez del Corral, R., Aroca, P., JL, G. m.-S., Cavodeassi, F. and Modolell, J.** (1999). The Iroquois homeodomain proteins are required to specify body wall identity in *Drosophila*. *Genes Dev* **13**, 1754-61.
- **Doherty, D., Feger, G., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1996). Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes Dev* **10**, 421-34.
- **Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S. A., Gayyed, M. F., Anders, R. A., Maitra, A. and Pan, D.** (2007). Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* **130**, 1120-33.
- **Dong, P. D., Todi, S. V., Eberl, D. F. and Boekhoff-Falk, G.** (2003). *Drosophila* spalt/spalt-related mutants exhibit Townes-Brocks' syndrome phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10293-8.
- **Eaton, S. and Kornberg, T. B.** (1990). Repression of ci-D in posterior compartments of *Drosophila* by engrailed. *Genes Dev* **4**, 1068-77.
- **Ebacher, D. J., Todi, S. V., Eberl, D. F. and Boekhoff-Falk, G. E.** (2007). Cut mutant *Drosophila* auditory organs differentiate abnormally and degenerate. *Fly (Austin)* **1**, 86-94.
- **Eberl, D. F. and Boekhoff-Falk, G.** (2007). Development of Johnston's organ in *Drosophila*. *Int J Dev Biol* **51**, 679-87.
- **Fanto, M., Clayton, L., Meredith, J., Hardiman, K., Charroux, B., Kerridge, S. and McNeill, H.** (2003). The tumor-suppressor and cell adhesion molecule Fat controls planar polarity via physical interactions with Atrophin, a transcriptional co-repressor. *Development* **130**, 763-74.



- **Feiguin, F., Hannus, M., Mlodzik, M. and Eaton, S.** (2001). The ankyrin repeat protein Diego mediates Frizzled-dependent planar polarization. *Dev Cell* **1**, 93-101.
- **Feng, Y. and Irvine, K. D.** (2007). Fat and expanded act in parallel to regulate growth through warts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20362-7.
- **Fiehler, R. W. and Wolff, T.** (2008). Nemo is required in a subset of photoreceptors to regulate the speed of ommatidial rotation. *Dev Biol* **313**, 533-44.
- **Fleming, R. J., Gu, Y. and Hukriede, N. A.** (1997). Serrate-mediated activation of Notch is specifically blocked by the product of the gene fringe in the dorsal compartment of the Drosophila wing imaginal disc. *Development* **124**, 2973-81.
- **García-Bellido, A. and Merriam, J. R.** (1971). Parameters of the wing imaginal disc development of Drosophila melanogaster. *Dev Biol* **24**, 61-87.
- **García-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G.** (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of Drosophila. *Nat New Biol* **245**, 251-3.
- **García-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G.** (1976). Developmental compartmentalization in the dorsal mesothoracic disc of Drosophila. *Dev Biol* **48**, 132-47.
- **Garoia, F., Guerra, D., Pezzoli, M. C., López-Varea, A., Cavicchi, S. and García-Bellido, A.** (2000). Cell behaviour of Drosophila fat cadherin mutations in wing development. *Mech Dev* **94**, 95-109.
- **Gómez-Skarmeta, J. L., Campuzano, S. and Modolell, J.** (2003). Half a century of neural prepatterning: the story of a few bristles and many genes. *Nat Rev Neurosci* **4**, 587-98.
- **Goodrich, L. V. and Strutt, D.** (2011). Principles of planar polarity in animal development. *Development* **138**, 1877-92.
- **Gopfert, M. C. and Robert, D.** (2001). Biomechanics. Turning the key on Drosophila audition. *Nature* **411**, 908.
- **Gopfert, M. C. and Robert, D.** (2002). The mechanical basis of Drosophila audition. *J Exp Biol* **205**, 1199-208.
- **Graveley, B. R., Brooks, A. N., Carlson, J. W., Duff, M. O., Landolin, J. M., Yang, L., Artieri, C. G., van Baren, M. J., Boley, N., Booth, B. W. et al.** The developmental transcriptome of Drosophila melanogaster. *Nature* **471**, 473-9.
- **Graves, H. K., Woodfield, S. E., Yang, C. C., Halder, G. and Bergmann, A.** Notch signaling activates Yorkie non-cell autonomously in Drosophila. *PLoS One* **7**, e37615.
- **Grimm, S. and Pflugfelder, G. O.** (1996). Control of the gene optomotor-blind in Drosophila wing development by decapentaplegic and wingless. *Science* **271**, 1601-4.

- **Gubb, D. and García-Bellido, A.** (1982). A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* **68**, 37-57.
- **Gubb, D., Green, C., Huen, D., Coulson, D., Johnson, G., Tree, D., Collier, S. and Roote, J.** (1999). The balance between isoforms of the prickle LIM domain protein is critical for planar polarity in *Drosophila* imaginal discs. *Genes Dev* **13**, 2315-27.
- **Guillen, I., Mullor, J. L., Capdevila, J., Sanchez-Herrero, E., Morata, G. and Guerrero, I.** (1995). The function of engrailed and the specification of *Drosophila* wing pattern. *Development* **121**, 3447-56.
- **Guo, Y., Zhao, X. and Yang, Z.** (2004). [Ciliogenesis in human nasal epithelial cells cultured at the air-liquid interface]. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* **18**, 88-90.
- **Halbleib, J. M. and Nelson, W. J.** (2006). Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev* **20**, 3199-214.
- **Han, C., Belenkaya, T. Y., Wang, B. and Lin, X.** (2004). *Drosophila* glypicans control the cell-to-cell movement of Hedgehog by a dynamin-independent process. *Development* **131**, 601-11.
- **Heisenberg, C. P., Tada, M., Rauch, G. J., Saude, L., Concha, M. L., Geisler, R., Stemple, D. L., Smith, J. C. and Wilson, S. W.** (2000). Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* **405**, 76-81.
- **Heitzler, P. and Simpson, P.** (1991). The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* **64**, 1083-92.
- **Held, L. I., Jr., Duarte, C. M. and Derakhshanian, K.** (1986). Extra joints and misoriented bristles on *Drosophila* legs. *Prog Clin Biol Res* **217A**, 293-6.
- **Inoue, H., Imamura, T., Ishidou, Y., Takase, M., Udagawa, Y., Oka, Y., Tsuneizumi, K., Tabata, T., Miyazono, K. and Kawabata, M.** (1998). Interplay of signal mediators of decapentaplegic (Dpp): molecular characterization of mothers against dpp, Medea, and daughters against dpp. *Mol Biol Cell* **9**, 2145-56.
- **Irvine, K. D. and Rauskolb, C.** (2001). Boundaries in development: formation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 189-214.
- **Irvine, K. D. and Wieschaus, E.** (1994). fringe, a Boundary-specific signaling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during *Drosophila* wing development. *Cell* **79**, 595-606.
- **Ishikawa, H. O., Takeuchi, H., Haltiwanger, R. S. and Irvine, K. D.** (2008). Four-jointed is a Golgi kinase that phosphorylates a subset of cadherin domains. *Science* **321**, 401-4.

- **Jarman, A. P., Grau, Y., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1993). atonal is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the Drosophila peripheral nervous system. *Cell* **73**, 1307-21.
- **Klein, T. J., Jenny, A., Djiane, A. and Mlodzik, M.** (2006). CKlepsilon/discs overgrown promotes both Wnt-Fz/beta-catenin and Fz/PCP signaling in Drosophila. *Curr Biol* **16**, 1337-43.
- **Kochhar, A., Hildebrand, M. S. and Smith, R. J.** (2007). Clinical aspects of hereditary hearing loss. *Genet Med* **9**, 393-408.
- **Krasnow, R. E., Wong, L. L. and Adler, P. N.** (1995). Dishevelled is a component of the frizzled signaling pathway in Drosophila. *Development* **121**, 4095-102.
- **Kumar, J. P. and Moses, K.** (2001). The EGF receptor and notch signaling pathways control the initiation of the morphogenetic furrow during Drosophila eye development. *Development* **128**, 2689-97.
- **Lawrence, P. A. and Morata, G.** (1992). Developmental biology. Lighting up Drosophila. *Nature* **356**, 107-8.
- **Lawrence, P. A., Struhl, G. and Casal, J.** (2007). Planar cell polarity: one or two pathways? *Nat Rev Genet* **8**, 555-63.
- **Lecuit, T., Brook, W. J., Ng, M., Calleja, M., Sun, H. and Cohen, S. M.** (1996). Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the Drosophila wing. *Nature* **381**, 387-93.
- **LeMasurier, M. and Gillespie, P. G.** (2005). Hair-cell mechanotransduction and cochlear amplification. *Neuron* **48**, 403-15.
- **Liu, X. and Lengyel, J. A.** (2000). Drosophila arc encodes a novel adherens junction-associated PDZ domain protein required for wing and eye development. *Dev Biol* **221**, 419-34.
- **Ma, D., C., Y., H., M., Simon, M. A. and Axelrod, J. D.** (2003). Fidelity in planar cell polarity signalling. *Nature* **421**, 543-547.
- **Mahoney, P. A., Weber, U., Onofrechuk, P., Biessmann, H., Bryant, P. J. and Goodman, C. S.** (1991). The fat tumor suppressor gene in Drosophila encodes a novel member of the cadherin gene superfamily. *Cell* **67**, 853-68.
- **Mao, Y., Kucuk, B. and Irvine, K. D.** (2009). Drosophila lowfat, a novel modulator of Fat signaling. *Development* **136**, 3223-33.
- **Mao, Y., Rauskolb, C., Cho, E., Hu, W. L., Hayter, H., Minihan, G., Katz, F. N. and Irvine, K. D.** (2006). Dachs: an unconventional myosin that functions downstream of Fat to regulate growth, affinity and gene expression in Drosophila. *Development* **133**, 2539-51.

- **Martin-Blanco, E., Pastor-Pareja, J. C. and García-Bellido, A.** (2000). JNK and decapentaplegic signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7888-93.
- **Matakatsu, H. and Blair, S. S.** Separating planar cell polarity and Hippo pathway activities of the protocadherins Fat and Dachshous. *Development* **139**, 1498-508.
- **Matakatsu, H. and Blair, S. S.** (2004). Interactions between Fat and Dachshous and the regulation of planar cell polarity in the *Drosophila* wing. *Development* **131**, 3785-94.
- **Matakatsu, H. and Blair, S. S.** (2006). Separating the adhesive and signaling functions of the Fat and Dachshous protocadherins. *Development* **133**, 2315-24.
- **Matakatsu, H. and Blair, S. S.** (2008). The DHHC palmitoyltransferase approximated regulates Fat signaling and Dachs localization and activity. *Curr Biol* **18**, 1390-5.
- **Mathews, C. K. V. H., K. E.; Ahern, Kevin G.** (2003). Biochemistry: Pearson.
- **Matis, M. and Axelrod, J. D.** Regulation of PCP by the Fat signaling pathway. *Genes Dev* **27**, 2207-20.
- **Matsuno, K., Diederich, R. J., Go, M. J., Blaumueller, C. M. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1995). Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development* **121**, 2633-44.
- **Milan, M. and Cohen, S. M.** (2000). Subdividing cell populations in the developing limbs of *Drosophila*: do wing veins and leg segments define units of growth control? *Dev Biol* **217**, 1-9.
- **Minami, M., Kinoshita, N., Kamoshida, Y., Tanimoto, H. and Tabata, T.** (1999). brinker is a target of Dpp in *Drosophila* that negatively regulates Dpp-dependent genes. *Nature* **398**, 242-6.
- **Mirkovic, I., Charish, K., Gorski, S. M., McKnight, K. and Verheyen, E. M.** (2002). *Drosophila* nemo is an essential gene involved in the regulation of programmed cell death. *Mech Dev* **119**, 9-20.
- **Mitchell, B., Stubbs, J. L., Huisman, F., Taborek, P., Yu, C. and Kintner, C.** (2009). The PCP pathway instructs the planar orientation of ciliated cells in the *Xenopus* larval skin. *Curr Biol* **19**, 924-9.
- **Moon, R. T., Bowerman, B., Boutros, M. and Perrimon, N.** (2002). The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* **296**, 1644-6.
- **Morton, N. E.** (1991). Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci* **630**, 16-31.
- **Neumann, C. J. and Cohen, S. M.** (1997). Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 871-80.

- **Ng, M., Díaz-Benjumea, F. J., Vincent, J. P., Wu, J. and Cohen, S. M.** (1996). Specification of the wing by localized expression of wingless protein. *Nature* **381**, 316-8.
- **Oh, H. and Irvine, K. D.** (2008). In vivo regulation of Yorkie phosphorylation and localization. *Development* **135**, 1081-8.
- **Padgett, R. W., St Johnston, R. D. and Gelbart, W. M.** (1987). A transcript from a Drosophila pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family. *Nature* **325**, 81-4.
- **Pan, D.** (2007). Hippo signaling in organ size control. *Genes Dev* **21**, 886-97.
- **Pan, G., Feng, Y., Ambegaonkar, A. A., Sun, G., Huff, M., Rauskolb, C. and Irvine, K. D.** Signal transduction by the Fat cytoplasmic domain. *Development* **140**, 831-42.
- **Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R. and Irvine, K. D.** (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* **387**, 908-12.
- **Pastor-Pareja, J. C., Grawe, F., Martin-Blanco, E. and García-Bellido, A.** (2004). Invasive cell behavior during Drosophila imaginal disc eversion is mediated by the JNK signaling cascade. *Dev Cell* **7**, 387-99.
- **Pfeiffer, B. D., Jenett, A., Hammonds, A. S., Ngo, T. T., Misra, S., Murphy, C., Scully, A., Carlson, J. W., Wan, K. H., Lavery, T. R. et al.** (2008). Tools for neuroanatomy and neurogenetics in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9715-20.
- **Phillips, R. G. and Whittle, J. R.** (1993). wingless expression mediates determination of peripheral nervous system elements in late stages of Drosophila wing disc development. *Development* **118**, 427-38.
- **Ramain, P., Khechumian, K., Seugnet, L., Arbogast, N., Ackermann, C. and Heitzler, P.** (2001). Novel Notch alleles reveal a Deltex-dependent pathway repressing neural fate. *Curr Biol* **11**, 1729-38.
- **Rauskolb, C., Pan, G., Reddy, B. V., Oh, H. and Irvine, K. D.** Zyxin links fat signaling to the hippo pathway. *PLoS Biol* **9**, e1000624.
- **Rock, R., Schrauth, S. and Gessler, M.** (2005). Expression of mouse dchs1, fjl1, and fat-j suggests conservation of the planar cell polarity pathway identified in Drosophila. *Dev Dyn* **234**, 747-55.
- **Rodríguez, I.** (2004). The dachsous gene, a member of the cadherin family, is required for Wg-dependent pattern formation in the Drosophila wing disc. *Development* **131**, 3195-3206.
- **Rogulja, D., Rauskolb, C. and Irvine, K. D.** (2008). Morphogen control of wing growth through the Fat signaling pathway. *Dev Cell* **15**, 309-21.

- **Rousset, R., Mack, J. A., Wharton, K. A., Jr., Axelrod, J. D., Cadigan, K. M., Fish, M. P., Nusse, R. and Scott, M. P.** (2001). Naked cuticle targets dishevelled to antagonize Wnt signal transduction. *Genes Dev* **15**, 658-71.
- **Sambrook J, F. E., Maniatis T, .** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual.: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- **Saucedo, L. J. and Edgar, B. A.** (2007). Filling out the Hippo pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 613-21.
- **Schwartz, C., Locke, J., Nishida, C. and Kornberg, T. B.** (1995). Analysis of cubitus interruptus regulation in Drosophila embryos and imaginal disks. *Development* **121**, 1625-35.
- **Schweisguth, F.** (2004). Regulation of notch signaling activity. *Curr Biol* **14**, R129-38.
- **Seifert, J. R. and Mlodzik, M.** (2007). Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat Rev Genet* **8**, 126-38.
- **Simcox, A. A., Grumbling, G., Schnepf, B., Bennington-Mathias, C., Hersperger, E. and Shearn, A.** (1996). Molecular, phenotypic, and expression analysis of vein, a gene required for growth of the Drosophila wing disc. *Dev Biol* **177**, 475-89.
- **Simmonds, A. J., Brook, W. J., Cohen, S. M. and Bell, J. B.** (1995). Distinguishable functions for engrailed and invected in anterior-posterior patterning in the Drosophila wing. *Nature* **376**, 424-7.
- **Simon, M. A., Xu, A., Ishikawa, H. O. and Irvine, K. D.** (2010). Modulation of fat:dachsous binding by the cadherin domain kinase four-jointed. *Curr Biol* **20**, 811-7.
- **Simons, M., Gault, W. J., Gotthardt, D., Rohatgi, R., Klein, T. J., Shao, Y., Lee, H. J., Wu, A. L., Fang, Y., Satlin, L. M. et al.** (2009). Electrochemical cues regulate assembly of the Frizzled/Dishevelled complex at the plasma membrane during planar epithelial polarization. *Nat Cell Biol* **11**, 286-94.
- **Simons, M. and Mlodzik, M.** (2008). Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annu Rev Genet* **42**, 517-40.
- **Singh, J. and Mlodzik, M.** Planar cell polarity signaling: coordination of cellular orientation across tissues. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **1**, 479-99.
- **Staley, B. K. and Irvine, K. D.** Hippo signaling in Drosophila: recent advances and insights. *Dev Dyn* **241**, 3-15.
- **Stern, C. and Bridges, C. B.** (1926). The Mutants of the Extreme Left End of the Second Chromosome of DROSOPHILA MELANOGASTER. *Genetics* **11**, 503-30.
- **Strutt, D. and Strutt, H.** (2007). Differential activities of the core planar polarity proteins during Drosophila wing patterning. *Dev Biol* **302**, 181-94.



- **Strutt, H. and Strutt, D.** (2002a). Nonautonomous planar polarity patterning in *Drosophila*: dishevelled-independent functions of frizzled. *Dev Cell* **3**, 851-63.
- **Tabata, T., Schwartz, C., Gustavson, E., Ali, Z. and Kornberg, T. B.** (1995). Creating a *Drosophila* wing de novo, the role of engrailed, and the compartment border hypothesis. *Development* **121**, 3359-69.
- **Tabata, T. and Takei, Y.** (2004). Morphogens, their identification and regulation. *Development* **131**, 703-12.
- **Tajiri, R., Misaki, K., Yonemura, S. and Hayashi, S.** (2011). Joint morphology in the insect leg: evolutionary history inferred from Notch loss-of-function phenotypes in *Drosophila*. *Development* **138**, 4621-6.
- **Taylor, J., Abramova, N., Charlton, J. and Adler, P. N.** (1998). Van Gogh: a new *Drosophila* tissue polarity gene. *Genetics* **150**, 199-210.
- **Thomas, C. and Strutt, D.** (2011). The roles of the cadherins Fat and Dachshous in planar polarity specification in *Drosophila*. *Dev Dyn*.
- **Todi, S. V., Sharma, Y. and Eberl, D. F.** (2004). Anatomical and molecular design of the *Drosophila* antenna as a flagellar auditory organ. *Microsc Res Tech* **63**, 388-99.
- **Usui, T., Shima, Y., Shimada, Y., Hirano, S., Burgess, R. W., Schwarz, T. L., Takeichi, M. and Uemura, T.** (1999). Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell* **98**, 585-95.
- **Verheyen, E. M., Mirkovic, I., MacLean, S. J., Langmann, C., Andrews, B. C. and MacKinnon, C.** (2001). The tissue polarity gene nemo carries out multiple roles in patterning during *Drosophila* development. *Mech Dev* **101**, 119-32.
- **Villano, J. L. and Katz, F. N.** (1995). four-jointed is required for intermediate growth in the proximal-distal axis in *Drosophila*. *Development* **121**, 2767-77.
- **Vladar, E. K., Antic, D. and Axelrod, J. D.** (2009). Planar cell polarity signaling: the developing cell's compass. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a002964.
- **Wallingford, J. B.** Planar cell polarity and the developmental control of cell behavior in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 627-53.
- **Wallingford, J. B., Rowning, B. A., Vogeli, K. M., Rothbacher, U., Fraser, S. E. and Harland, R. M.** (2000). Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature* **405**, 81-5.
- **Wang, J., Mark, S., Zhang, X., Qian, D., Yoo, S. J., Radde-Gallwitz, K., Zhang, Y., Lin, X., Collazo, A., Wynshaw-Boris, A. et al.** (2005). Regulation of polarized extension and planar cell polarity in the cochlea by the vertebrate PCP pathway. *Nat Genet* **37**, 980-5.

- **Wang, S. H., Simcox, A. and Campbell, G.** (2000). Dual role for Drosophila epidermal growth factor receptor signaling in early wing disc development. *Genes Dev* **14**, 2271-6.
- **Whitworth, A. J. and Russell, S.** (2003). Temporally dynamic response to Wingless directs the sequential elaboration of the proximodistal axis of the Drosophila wing. *Dev Biol* **254**, 277-88.
- **Willecke, M., Hamaratoglu, F., Kango-Singh, M., Udan, R., Chen, C. L., Tao, C., Zhang, X. and Halder, G.** (2006). The fat cadherin acts through the hippo tumor-suppressor pathway to regulate tissue size. *Curr Biol* **16**, 2090-100.
- **Willecke, M., Hamaratoglu, F., Sansores-García, L., Tao, C. and Halder, G.** (2008). Boundaries of Dachshous Cadherin activity modulate the Hippo signaling pathway to induce cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14897-902.
- **Wolff, T. and Rubin, G. M.** (1998). Strabismus, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in Drosophila. *Development* **125**, 1149-59.
- **Xu, T. and Rubin, G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. *Development* **117**, 1223-37.
- **Yang, C. H., Axelrod, J. D. and Simon, M. A.** (2002). Regulation of Frizzled by fat-like cadherins during planar polarity signaling in the Drosophila compound eye. *Cell* **108**, 675-88.
- **Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G.** (1996). Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* **87**, 833-44.
- **Zecca, M. and Struhl, G.** (2002a). Control of growth and patterning of the Drosophila wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* **129**, 1369-76.
- **Zecca, M. and Struhl, G.** (2002b). Subdivision of the Drosophila wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* **129**, 1357-68.
- **Zeng, Y. A., Rahnama, M., Wang, S., Sosu-Sedzorme, W. and Verheyen, E. M.** (2007). Drosophila Nemo antagonizes BMP signaling by phosphorylation of Mad and inhibition of its nuclear accumulation. *Development* **134**, 2061-71.
- **Zhao, X., Yang, C. H. and Simon, M. A.** The Drosophila Cadherin Fat regulates tissue size and planar cell polarity through different domains. *PLoS One* **8**, e62998.

